Kemija vitamina B6 i sinteza novih analoga vitamina B6

Živković, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:552557

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Ivana Živković

KEMIJA VITAMINA B_6 I SINTEZA NOVIH ANALOGA VITAMINA B_6

ZAVRŠNI RAD

Osijek, 2016.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dean Marković

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

SAŽETAK

Vitamin B_6 je generički naziv za skupinu od šest spojeva: piridoksin, piridoksal piridoksamin i njihove 5'-fosfate odnosno 3-hidroksi-2-metil-5-hidroksimetil piridinske derivate. Prva totalna sinteza vitamina B_6 je provedena kondenzacijom 1-etoksipentan-2,4-diona i cijanacetamida. Svim živim bićima potreban je vitamin B_6 za opstanak. Međutim, samo su mikroorganizmi i biljke sposobni sintetizirati ga *de novo.* Uloga vitamina B_6 je vezana uz brojne metaboličke procese, te također ima ulogu i kao kofaktor u nekim enzimski kataliziranim reakcijama. Vitamin B_6 je esencijalan za više od 100 enzima koji su uključeni u sintezu proteina. Najviše je proučavana koenzimatska aktivnost piridoksal-5'-fosfata (PLP), PLP-ovisni enzimi su uključeni u važne korake metabolizma aminokiselina, procesima dekarboksilacije i racemizacije, formiranja hemoglobina i biosintezi klorofila. Vitamin B_6 bi mogao imati ulogu u sprečavanju oksidativnog stresa stanica. Manjak vitamina B_6 u ljudskoj prehrani uključuje niz posljedica, odnosno nastanka bolesti, ozbiljnih i manje ozbiljnih kao npr. hiperhomocistein anemija i povećan rizik za arterosklerozu.

Ključne riječi: vitamin B_6, piridoksin, piridoksal, piridoksamin

ABSTRACT

Vitamin B_6 exists in three basic chemical forms: pyridoxine (an alcohol), pyridoxal (an aldehyde) and pyridoxamine (a primary amine). The three major forms can be phosphorylated at the 5'-hydroxymethyl group. The first total synthesis of vitamin B_6 was obtained by the condensation of acetylacetone and cyanacetamide. All living beings need vitamin B_6 for their existence. However, only microorganisms and plants are able to synthesize it *de novo*. The role of vitamin B_6 is related to a number of metabolic processes , and also plays a role like a cofactor in certain enzyme-catalyzed reactions. Vitamin B_6 is essential for more than 100 enzymes involved in protein metabolism. The most studied coenzymic activity is one of the pytidoxal-5'-phosfate (PLP), PLP-dependent enzymes are involved in important steps of amino acid metabolism, processes of decarboxylation and racemization, hemoglobin formation and chlorophyll biosynthesis. Vitamin B_6 could have a role in preventing oxidative stress of the cells. A deficiency of vitamin B_6 in the human diet encompasses the full spectrum of clinical disorders, some of them more serious, such as hyperhomocysteinaemia and increases the risk for atherosclerosis.

Key words: vitamin B_6, pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine

SADRŽAJ

1. UVOD 4
2. KEMIJSKA STRUKTURA I FUNKCIJA VITAMINA B_6 5
2.1. Funkcija vitamina B_6 8
2.2. Izvori vitamina B_6 10
2.3. Nedostatak vitamina B_6 10
3. OTKRIĆE VITAMINA B_6 11
3.1. Struktura piridoksina 13
3.2. Sinteza piridoksamina i piridoksala 22
3.3. Piridoksal fosfat i piridoksamin fosfat 25
4. RAZNOLIKOST DERIVATA VITAMINA B_6 29
5. ZAKLJUČAK 34
6. POPIS LITERATURE 35

1. UVOD

Vitamini su organski spojevi potrebni u manjim količinama za normalan rad stanice. Biljke i mnogi „primitivni“ organizmi mogu iz najjednostavnijih sastojaka, odnosno iz izvora dušika, ugljika, mineralnih spojeva i energije, uzgraditi sve spojeve potrebne za svoj rast. Za razliku od biljaka, ljudi ne mogu sintetizirati neke spojeve kao npr. određene aminokiseline (esencijalne) i vitamine, pa ih moramo uzimati putem hrane. U normalnim uvjetima prehrane ne dolazi do problema i bolesti vezanih uz nedostatak određenih vitamina kao npr. avitaminoze. Najčešći simptomi avitaminoze su umor, nedostatak daha, vrtoglavica, nepravilni otkucaji srca, mišićna slabost itd. Ozbiljniji oblik bolesti su hipovitaminoze, odnosno relativno stanje manjka vitamina koje još ne dovodi do klasične slike bolesti.

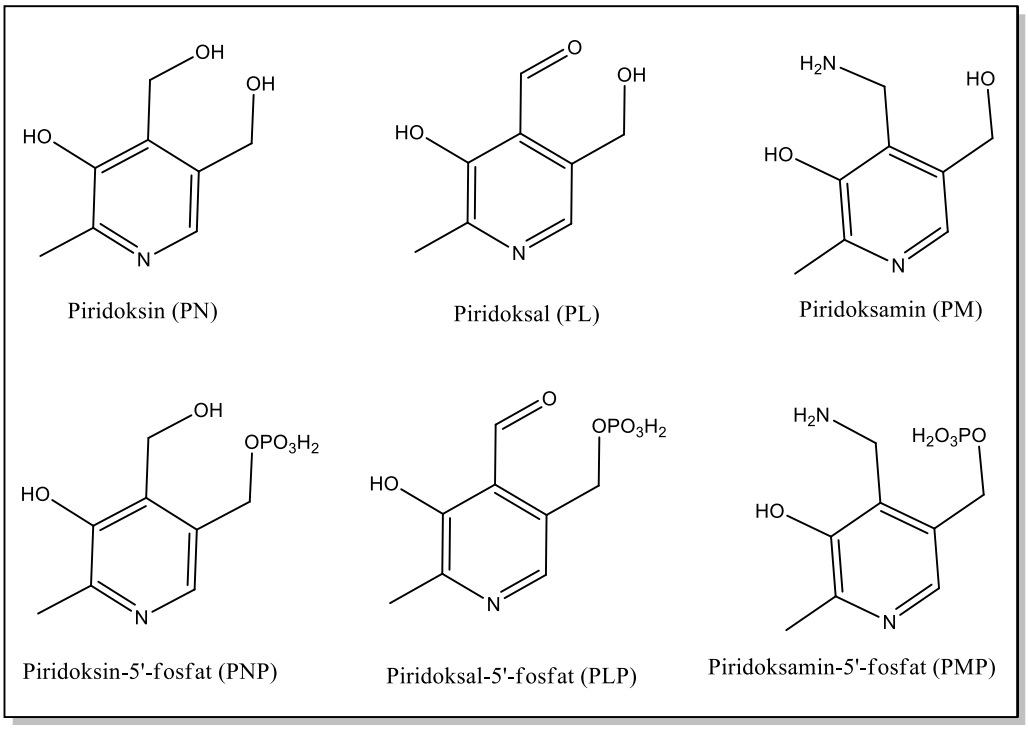
Uobičajena podjela vitamina, prema fizikalnom svojstvu topljivosti, je podjela na vitamine topljive u masti (D, E, K, A) i vitamine topljive u vodi (B, C). Vitamin B_6 je vitamin topljiv u vodi,. Izraz vitamin B_6 obuhvaća šest spojeva: piridoksin, piridoksal, piridoksamin i njihove fosforilirane oblike.

Cilj ovog rada je opisati vitamin B_6, te nove analoge vitamina B_6. Nešto općenito o vitaminu B_6 je opisano u poglavlju „Kemijska struktura i funkcija vitamina B_6“. Nadalje, opisani su izvori vitamina B_6, zatim što se može dogoditi ukoliko ne unosimo potrebne količine vitamina B_6 te samim tim i liječenja ukoliko dođe do oboljenja uslijed nedostatka vitamina. Nešto detaljnije opisano je otkriće vitamina B_6 i njegova povijest. Na samom kraju opisani su derivati odnosno analozi vitamina B_6.

2. KEMIJSKA STRUKTURA I FUNKCIJA VITAMINA B_6

Vitamin B_6 je vitamin topljiv u vodi. To znači da se takvi vitamini raspadaju u vodi, pa ih zapravo tijelo ne može pohranjivati u sebi, ostatci vitamina napuštaju tijelo mokraćom. Kao spoj, vitamin B_6 nije homologan, odnosno čine ga piridoksin, piridoksal, piridoksamin i njihovi fosforilirani derivati **[4]**. Naziv vitamin B_6 koristi se za skupinu 3-hidroksi-2-metil-5-hidroksimetilpiridin derivata, koji se razlikuju prema prirodi supstituenta na četvrtom mjestu piridinskog prstena. Zamjenom $–CH_2OH$ skupine na četvrtom mjestu piridoksina sa $–CH_2NH_2$ odnosno –CHO, dobiva se piridoksamin odnosno piridoksal **[9]**.

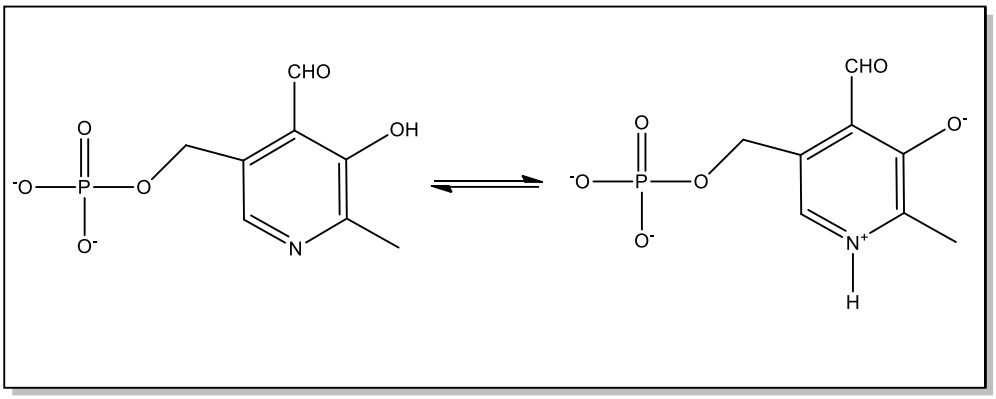
Ime piridoksin (PN) je trivijalno dodijeljeno jednoj komponenti vitamina B_6 u kojoj je supstituent hidroksimetil, pri čemu bi ukupan naziv spoja bio 3-hidroksi-4,5-bis(hidroksimetil)-2-metilpiridin. Biološki aktivni analozi su piridoksal (aldehid, PL, 2-metil-3-hidroksi-4-formil-5-hidroksimetilpiridin) i piridoksamin (amin, PM, 2-metil-3-hidroksi-4-aminometil-5-hidroksimetilpiridin) **[3].** Ove 3 osnovne forme mogu biti fosforilirane na 5'-hidroksimetilnoj skupini pri čemu nastaje piridoksin-5'-fosfat (PNP), piridoksal-5'-fosfat (PLP), piridoksamin-5'-fosfat (PMP) **[4]**. Strukturne formule komponenti vitamina B_6 i njihovi fosforilirani oblici su prikazani na ***Slici 1***.



Slika 1. *Kemijske strukture komponenti vitamina B_6*

Svi oblici vitamina B_6 su bezbojni kristali pri sobnoj temperaturi. Otapaju se u vodi, ali su minimalno topljivi u organskim otapalima. Veliku važnost ima velika stabilnost vitamina B_6 što je važno za industriju hrane kao i za potrošače. Komponente vitamina B_6 su osjetljive na utjecaj pH, iako ostaju relativno stabilne u kiselom mediju, u alkalnom to nije slučaj. Procesiranjem namirnica dolazi do gubitka vitamina B_6. Kuhanjem mesa gubi se oko 45% i 20-30% kuhanjem povrća. Najstabilnija forma vitamina B_6 je piridoksal. Vitamin B_6 je stabilan prema povećanju temperature, ali je osjetljiv na zrak, UV svjetlo. Pod utjecajem svjetlosti kao i oksidacijom brzo se raspada **[9].**

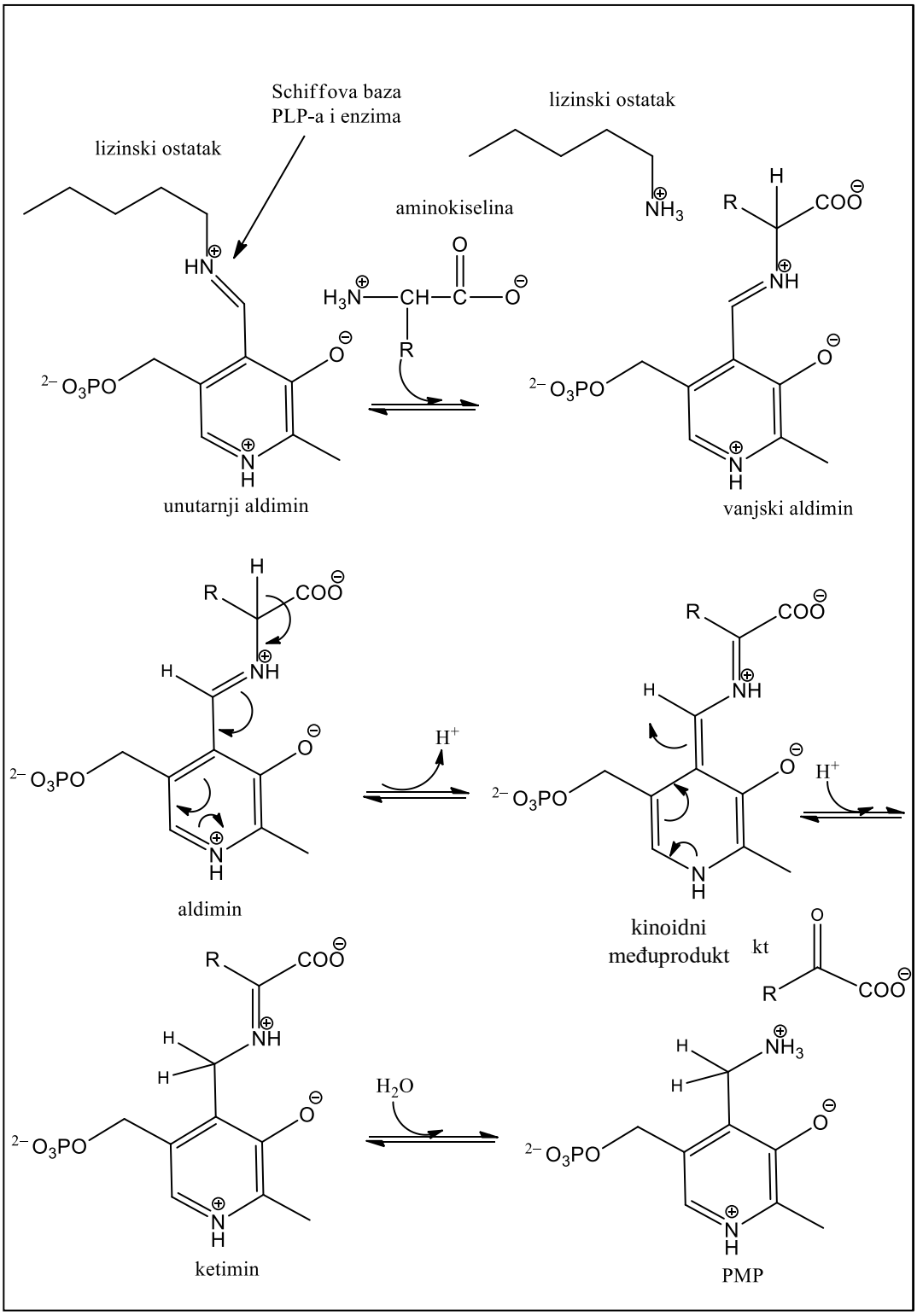
Piridoksal-fosfat sadržava piridinski prsten koji je slabo bazičan, na koji je vezana OH skupina, koja je slabo kisela. Stoga PLP postoji u dvije stabilne tautomerne forme koje su prikazane na ***Slici 2***., u kojima je piridinski dušikov atom protoniran i stoga pozitivno nabijen, dok OH skupina gubi proton, negativno je nabijena i stvara fenolat **[9]**.



Slika 2. *Tautomerni oblici PLP (keto i enolni oblik)*

Najvažnija funkcijska skupina PLP-a je aldehidna skupina. Ta skupina tvori sa aminokiselinskim supstratima kovalentne međuprodukte tipa Schiffovih baza povezanih sa ε-amino skupinom specifičnog lizinskog ostatka u aktivnom mjestu enzima. Ulaskom aminokiselinskog supstrata stvara se nova Schiffova baza. α-Amino skupina aminokiselinskog supstrata zamjenjuje ε-amino skupinu lizinskog ostatka. Schiffova baza stvorena između aminokiseline i PLP-a ostaje čvrsto vezana uz enzim, i to višestrukim nekovalentnim vezama. Mehanizam transaminacije prikazan je na ***Slici 3***.**[1]**

Schiffova baza između aminokiselinskog supstrata i PLP-a, vanjski aldimin, otpušta proton s α-C atoma aminokiseline i nastaje kinoidni međuprodukt. Ponovnim vezanjem protona



Slika 3. *Mehanizam transaminacije*

na aldehidni ugljikov atom tog međuprodukta nastaje ketimin, ketimin se potom hidrolizira u α-ketokiselinu i PMP. **[1]**

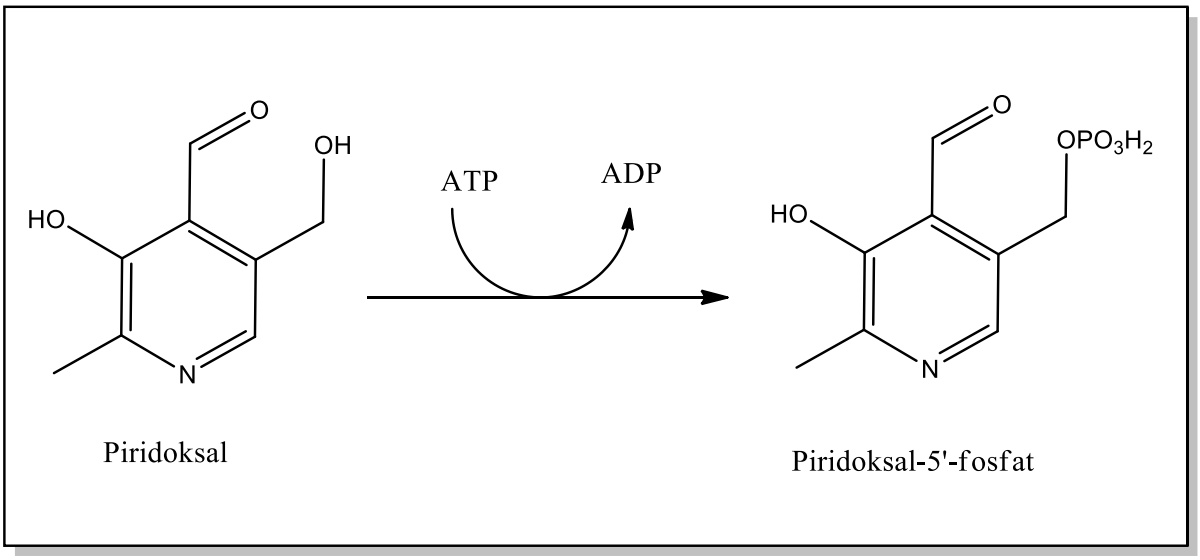
$$\text{aminokiselina}_1 + \text{E-PLP} \rightleftharpoons \alpha\text{-ketokiselina}_1 + \text{E-PMP}$$

Druga se polovica cjelokupne reakcije zbiva obratom gornjeg niza reakcija. Pri tome druga alfa-ketokiselina reagira s kompleksom E-PMP te se dobiva druga aminokiselina, a ujedno se regenerira E-PLP. **[1]**

$$\alpha\text{-ketokiselina}_2 + \text{E-PMP} \rightleftharpoons \text{aminokiselina}_2 + \text{E-PLP}$$

2.1. Funkcija vitamina B_6

Sve forme vitamina B_6 posjeduju vitaminsku aktivnost zato što se mogu pretvoriti *in vivo* u piridoksal. PN, PM i PL se pretvaraju u 5'-fosfat pomoću enzima kinaze. Piridoksal se pretvara u piridoksal-5'-fosfat reakcijom prikazanom na ***Slici 4***. **[12]**. PNP i PMP se prevode u PLP djelovanjem flavin ovisne oksidaze, to je razlog zašto nedostatak vitamina B_2 dovodi i do smanjenja raspoloživog PLP-a.



Slika 4. *Reakcija nastajanja piridoksal-5-fosfata*

Brojni PLP-ovisni enzimi kataliziraju važne korake u sintezi aminokiselina (transaminacija, racemizacija, dekarboksilacija, α,β-eliminacijske reakcije) **[10]**. Raznoliko djelovanje PLP posljedica je sposobnosti stvaranja stabilne Schiff-ove baze s amino skupinama kao i mogućnosti da djeluje kao elektron akceptor i stabilizira reakcijske intermedijere. PLP-ovisni enzimi također imaju važnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Ovaj vitamin je nužan za razmnožavanje stanica te kao takav igra važnu ulogu u trudnoći i pravilnoj funkciji imunosnog sustava, održavanja ravnoteže natrija i kalija, mukozne membrane, kože,

crvenih krvnih zrnaca, radu mozga, moduliranju hormona, formiranju niacina, metabolizmu lipida i glukoneogenezi **[5]**.

Vitamin B_6 pomaže tijelu sintetizirati neke neurotransmitere koji su ključni za normalan razvoj mozga. Zajedno s vitaminima B_{12} i B_9 pomaže kontrolirati razinu homocisteina, molekule povezane sa srčanim bolestima. Nužan je i za apsorpciju vitamina B_{12} i produkciju eritrocita i bijelih krvnih stanica zaduženih za imunitet. Vitamin B_6 također je nužan za pretvorbu triptofana, esencijalne aminokiseline u niacin, a nužan je i za sintezu DNA i RNA. Osim funkcije kao kofaktora u enzimima, u posljednjem desetljeću otkriveno je da bi vitamin B_6 mogao imati ulogu u sprječavanju oksidativnog stresa i da je važan za suzbijanje singleta kisika **[2].**

PLP ovisni enzimi su uključeni u reakciji formiranja hemoglobina i biosintezi klorofila. Hemoglobin je protein koji je prisutan u crvenim krvnim zrncima i njegova primarna uloga je da prenosi kisik u tijelu. Glavna komponenta hemoglobina je skupina hem, koja zapravo veže kisik. Početna proizvodnja skupine hem u tijelu zahtijeva prisutnost vitamina B_6. PLP u reakciji glikogen fosforilaze ostaje čvrsto vezan kroz svoju karbonilnu skupinu lizina i ponaša se kao protonski pufer kako bi ubrzao fosforolizu glikogena od strane anorganskog fosfata. PLP je uključen u metabolizmu masnih kiselina i zajedno s cinkom i magnezijem je potreban za djelovanje δ-6-desaturaze. U mozgu PLP-ovisni enzim aromatska L-aminokiselina dekarboksilaza, katalizira sintezu dva važna neurotransmitera: serotonina iz triptofana i dopamina iz L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA). Drugi neurotransmiteri, uključujući glicin, D-serin, glutamat, histamin i dr. se sintetiziraju u reakcijama kataliziranih sa PLP-ovisnim enzimima [**11**].

Ovaj vitamin se uspješno koristio u liječenju ekcema, gubitku i stanjivanju kose, povišenim razinama kolesterola, zubnim bolestima te dijabetesu. Također, pokazano je da ima ulogu i u sprječavanju stresa, pogotovo u kombinaciji s cinkom. Nekoliko istraživanja pokazalo je da uzimanje 30 mg vitamina B_6 dnevno smanjuje jutarnje mučnine kod trudnica. On također sudjeluje u proizvodnji serotonina čiji je nedostatak povezan s depresijom, pa se pretpostavlja da bi njegovo uzimanje moglo pomoći kod liječenja depresije. Neka istraživanja i iskustva pacijentica pokazala su da vitamin B_6 ublažava simptome PMS-a. Istraživanja pokazuju da vitamin B_6 smanjuje rizik od Parkinsonove bolesti **[5]**.

2.2. Izvori vitamina B_6

Vitamina B_6 ima u biljnom i životinjskom tkivu, osobito u jetri i bubrezima, zatim u kvascu, ribi, cjelovitim žitaricama, soji, jajima, mlijeku te voću (osobito suho voće, banane, avokado) i povrću (špinat, pšenične klice). Preporučena dnevna doza ovog vitamina iznosi 1-2 miligrama na dan, a potreba za vitaminom se povećava tijekom starenja, trudnoće i dojenja, te korištenja kontracepcijskih tableta. Istraživanja su pokazala da intravenozno uzimanje i do 200 mg nema toksični učinak, a uzimanje 100 do 300 mg ublažava oštećenja živčanih stanica uslijed uzimanja droge bez neželjenog efekta. Ipak, istraživanja se pokazala da kod nekih ljudi uzimanjem mnogo većih doza i tijekom dužeg vremena, dovodi do oštećenja živčanih stanica **[5]**.

2.3. Nedostatak vitamina B_6

Svakodnevna opskrba vitaminom B_6 zajedno s ostalim vitaminima B-kompleksa nužna je zato što se oni izlučuju putem urina u roku od 8 sati nakon ulaska u organizam i ne mogu se skladištiti u jetri. Nedostatak vitamina B_6 je vrlo rijedak, javlja se kod primjene nekih lijekova ili je vezan za nedostatak nekih drugih vitamina B-kompleksa. Simptomi nedostatka vitamina B_6 slični su simptomima nedostatka niacina i riboflavina, a očituju na koži i u središnjem živčanom sustavu. Dolazi i do slabosti mišića, nervoze, iritabilnosti, depresije, slabe koncentracije i gubitak kratkoročnog pamćenja, gubitka kose, artritisa, poremećaja učenja, slabost, pojava akni. Iako je nedostatak vitamina B_6 rijedak, može se javiti kod alkoholičara, bubrežnih bolesnika, žena koje uzimaju kontracepcijske tablete te kod poremećaja rada imunosnog sustava **[5]**.

Kod trudnica nedostatkom ovog vitamina dolazi do većeg zadržavanja vode, te ukoliko se kroz duži period ne dobiju potrebne količine, žena može roditi mrtvo dijete ili može doći do kasnog porođaja. Novorođenčad čije majke nisu uzimale potrebne količine ovog vitamina, se rađaju s konvulzijama**.**

Pokazalo se da ljudi koji prehranom ne uzimaju dovoljno ovog vitamina, imaju veći rizik od razvitka srčanih bolesti. Brojne studije pokazale su da osobe sa niskim razinama PLP-a imaju mnogo veći rizik srčanog udara od osoba sa većim razinama PLP-a. **[5] .**

3. OTKRIĆE VITAMINA B_6

Formulu vitamina B_6 je prvi put objavio S. Ohdake 1932. godine (Isolation of "Oryzanin" (Antineuritic Vitamin) from Rice-polishings. (First Report,). *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 8, 1932., 11–46) u isto vrijeme kada su i druge skupine znanstvenika radile na objašnjavanju ostalih spojeva iz skupine vitamina B. On je radio na izolaciji iz riže spoja kojeg je nazvao orizanin (vitamin B_1) i otkrio vitamin B_6 kao sporedni produkt. Opisao je formulu, ali nije znao da je otkrio vitamin i nije prepoznao njegovu važnost. Istraživanja koja su se bavila aktivnošću vitamina B_6 i njegovim pročišćavanjem u to vrijeme su bila otežana zbog nedostataka podataka na temelju kojih bi se razlikovali riboflavin (vitamin B_2) i vitamin B_6, a koja su bila bitna, zbog tog što su sve biljke i životinje sadržavale ove supstance.

Piridoksin je prvi izoliran u kristalnom obliku iz kvasca i iz riže. Nekoliko godina prije izolacije ovog vitamina, György je 1934. godine definirao vitamin B_6 kao dio vitamina B kompleksa odgovoran za liječenje posebnog dermatitisa kod štakora **[3]**. György je 1934. prvi put opisao vitamin B_6 tj. imenovao je supstancu piridoksin, zbog strukturne sličnosti s piridinom. Pročišćavanje i izolacija vitamina B_6 brzo se razvijala, kroz prvih pet mjeseci 1938. godine, pet istraživačkih skupina je objavilo svoja istraživanja. Keresztesy, Sevens i Lepkovsky su objavili izolaciju kristalnog vitamina B_6 u veljači; Kuhn i Wendt i György sličnu objavu u travnju, te Ichiba i Michi koji su opisali hidroklorid vitamina B_6 u lipnju. Isprva se smatralo da postoji samo piridoksin kao oblik vitamina B_6 sve dok nisu Snell i njegovi suradnici otkrili i druge aktivne oblike, odnosno piridoksal i piridoksamin **[3]**. Schlenk i Snell su prvi zaključili da da fosforilirani piridoksal služi kao koenzim u enzimskoj transaminaciji L-α-aminokiselina **[10]**. Oni su uočili da je kod štakora koji nisu imali dovoljne količine vitamina B_6 nastala mala, odnosno manja aktivnost transaminaze, za razliku od onih koji su imali dovoljnu količinu vitamina B_6. Snell je objavio i ne-enzimsku interkonverziju piridoksala i piridoksamina grijanjem glutaminske kiseline s piridoksalom ili grijanjem α-ketoglutarne kiseline s piridoksaminom, te je upravo ove reakcije naveo kao dokaz za ulogu derivata piridoksala u enzimskoj transaminaciji **[3].**

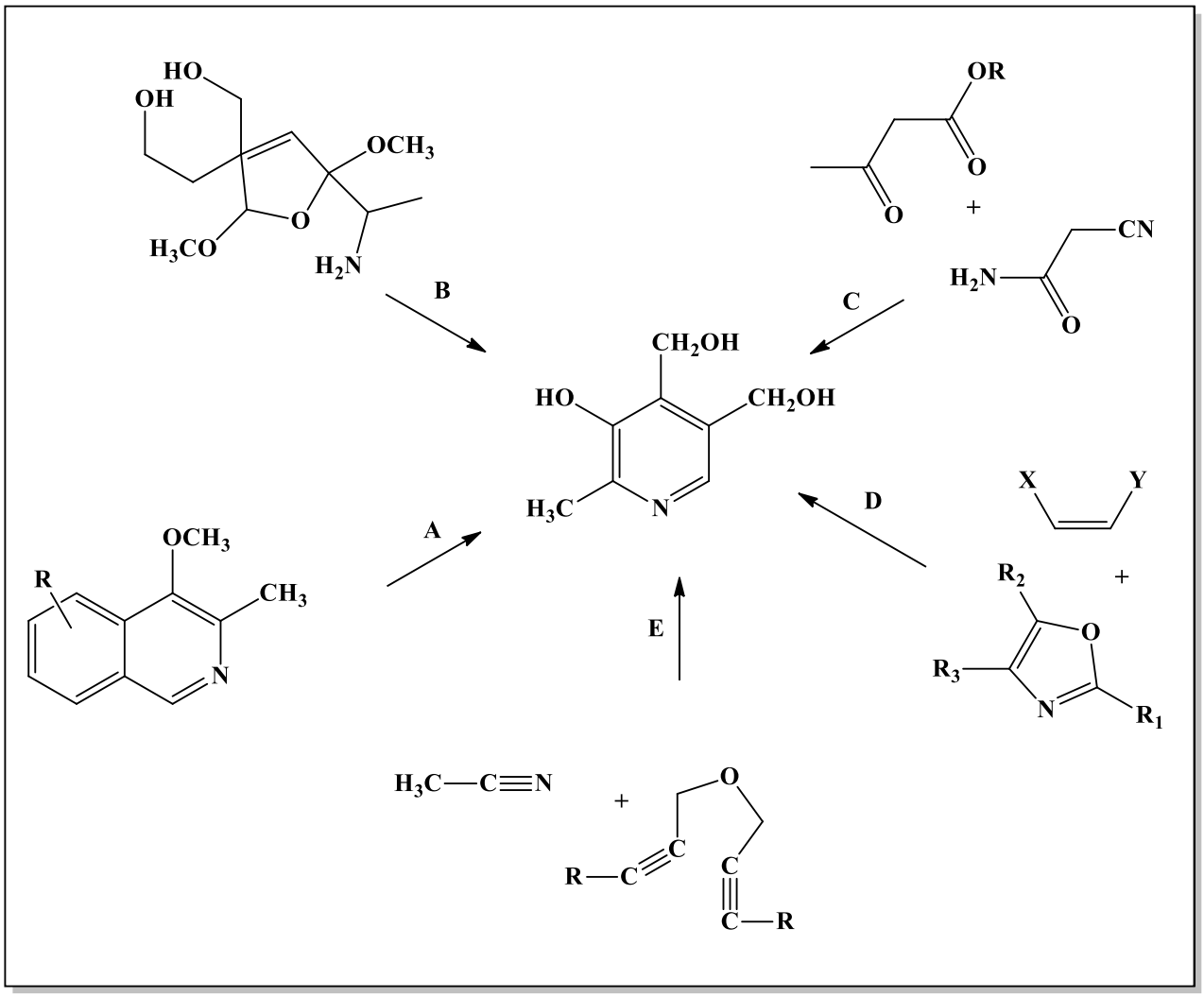
Prva totalna sinteza je izvedena 1939. godine od strane tri skupine znanstvenika (Harris i Folkers 1939.; Ichiba i Michi 1939.; Kuhn i ostali 1939.). Harris i Folkers su također opisali i sintezu piridoksina koju su kasnije proširili i prilagodili za industrijske svrhe. Sinteza je bazirana na kondenzacij 1-etoksipentan-2,4-diona i cijanacetamida. Prema Harrisu i Folkersu

sintetički vitamin B_6 hidroklorid je kemijski identičan prirodnom vitaminu B_6 hidrokloridu i ima biološku aktivnosti **[3]**.

Industrijski se piridoksin-hidroklorid proizvodi u obliku bijelog, bezmirisnog, gorkokiselog u vodi topljivog kristaliničnog praha. Zbog velikog broja reaktivnih i na piridinskom prstenu nesimetrično položenih supstituenata, a posebno zbog hidroksilne skupine u položaju 3, izbor sintetske strategije za pripremu piridoksina više je nego lak.

Sinteze piridoksina se dijele u dvije skupine:

- sinteze koje polaze od supstrata sa formiranim prstenom
- sinteze u kojima je potrebno formirati prsten, ***Slika 5.***



Slika 5. *Sintetski putevi priprave piridoksina*

A. oksidacijska razgradnja, redukcija nastalih piridin.dikarboksilnih kiselina
B. acetiliranje, oksimiranje, hidriranje, elektrometoksiliranje, hidroliza, intramolekularna reciklizaciija
C. nitriranje, kloriranje, hidriranje, diazotacija, hidroliza
D. cikloadicija, fragmentacija, aromatizacija
E. ciklotrimerizacija

Sinteze piridoksina koje polaze od supstrata s njegovim već izgrađenim prstenom (put A) temelje se na oksidativnoj razgradnji kinolinskih i izokinolinskih derivata u piridindikarboksilne kiseline, a potom na njihovoj redukciji u piridoksin, a poslužile su i za određivanje njegove konstitucije. U skupini sinteza uz izgradnju skeleta piridoksina iz jednog segmenta najpoznatije su one koje polaze od 3,4-diacetoksimetilfurana, koji alkiliranjem, oksimiranjem, hidratiranjem, elektrometoksiliranjem te potom hidrolizom i intramolekularnom reciklizacijom daje piridin (put B). Međutim, sintezama koje prsten izgrađuju od dva segmenta dvije principijelno različite varijante od posebnog su značenja. Ranije spomenuta Harris i Folkers-ova sinteza kondenzacije cijanoacetamida i alkoksiacetilacetona (put C). Takvom sintezom nastaje višestruko supstituiran piridonski derivat koji se reakcijama nitriranja, kloriranja, hidriranja, diazotacije i hidrolize prevodi u piridoksin. Diels-Alderova reakcija se pokazala vrlo korisnom u organskoj sintezi i višestruko se koristi za pripravu spojeva sa šesteročlanim prstenovima. Nova serija derivata piridina i analoga vitamina B_6 je sintetizirana Diels-Alderovom reakcijom 2,4-dimetil-5-methoksioksazola sa različitim tipovima dienofila **[9]**.

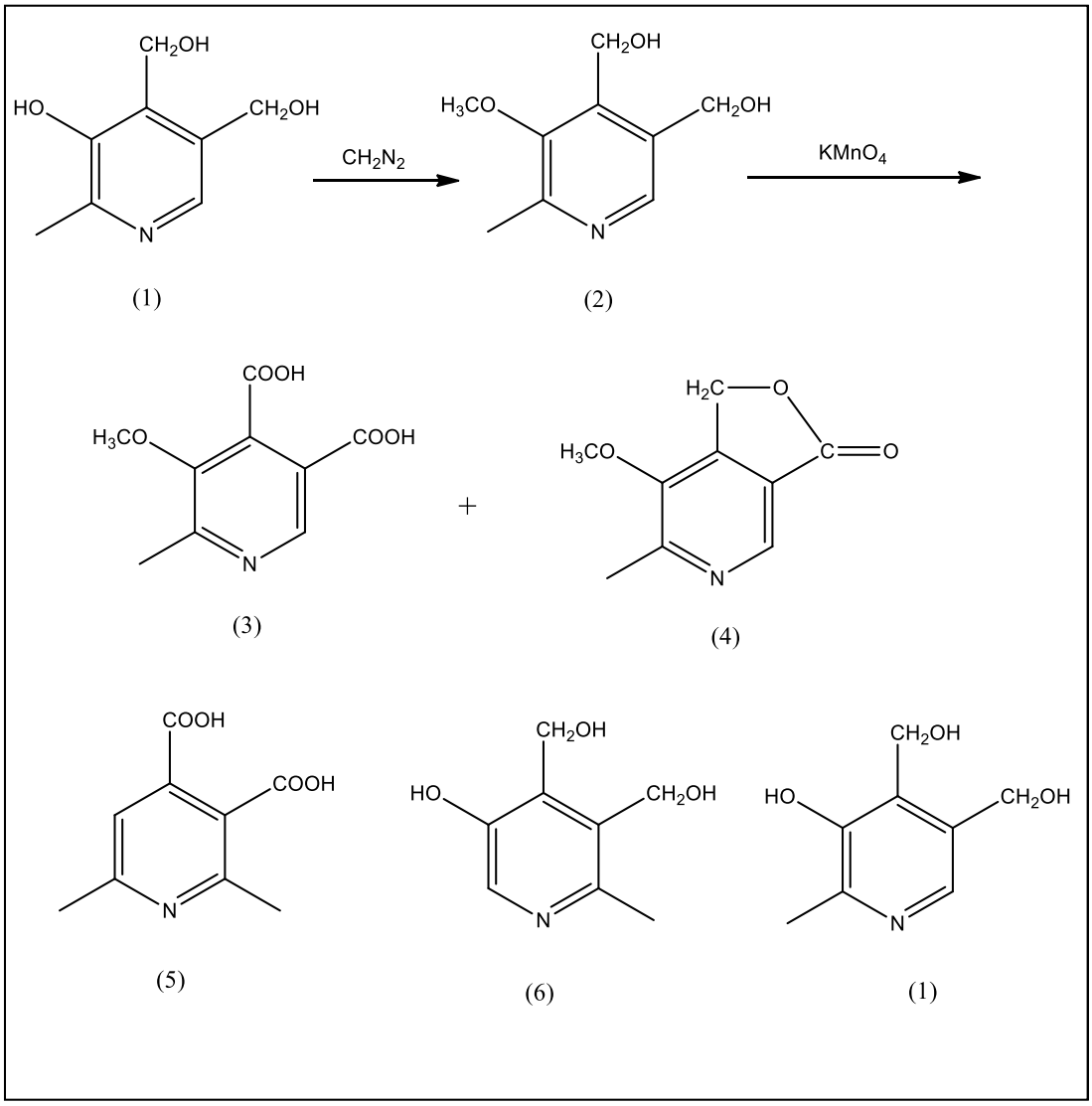
3.1. Struktura piridoksina

Piridoksin je prvenstveno bio izoliran iz kvasca, a zatim i iz riže. Izoliran je kao hidroklorid $C_8H_{12}ClNO$, baze $C_8H_{11}NO_3$ kako je bilo određeno elementarnom analizom. Empirijska formula koja je također predstavljala i molekulsku formulu, određena je na način uz promatranje titracijske krivulje hidroklorida tako što je utvrđeno da je ona imala samo jedan prijelom. Baza je bila optički inaktivna te stabilna prema kiseloj i alkalnoj hidrolizi, dušičnoj kiselini te Fehlingovoj otopini. Sadržavala je tri aktivna vodikova atoma, C-metilnu skupinu i fenolnu skupinu. Međutim, dokazi ukazuju na odsutnost alkoksidne te alkilamino skupine.

Prema ovim podatcima slobodna baza je imala karakter cikličkog tercijarnog amina. Djelovanjem željezova klorida na piridoksin dobivena je crvena boja, koja je bila slična onoj dobivenoj reakcijom željezova klorida i 3-hidroksipiridina. Ionizacijska konstanta te varijacije u ultraljubičastom spektru su bile analogne nekoliko 3-hidroksipiridinskih derivata. Na temelju gore navedenih dokaza zaključeno je da je piridoksin supstituirani 3-hidroksipiridin.

Karakter i položaj ostalih funkcijskih skupina određeni su procesom oksidacije, ***Slika 6***. Metil eter piridoksina (**2**) dobiven je reakcijom s diazometanom. Oksidacijom produkta utrošena su približno četiri ekvivalenta kalijevog permanganata, pri čemu su nastali lakton (**4**) i dikarboksilna kiselina (**3**). Sličnosti između (**5**) i (**3**) su bile vidljive usporedbom njihovih pKa vrijednosti i iz ultraljubičastog absorpcijskog spektra.

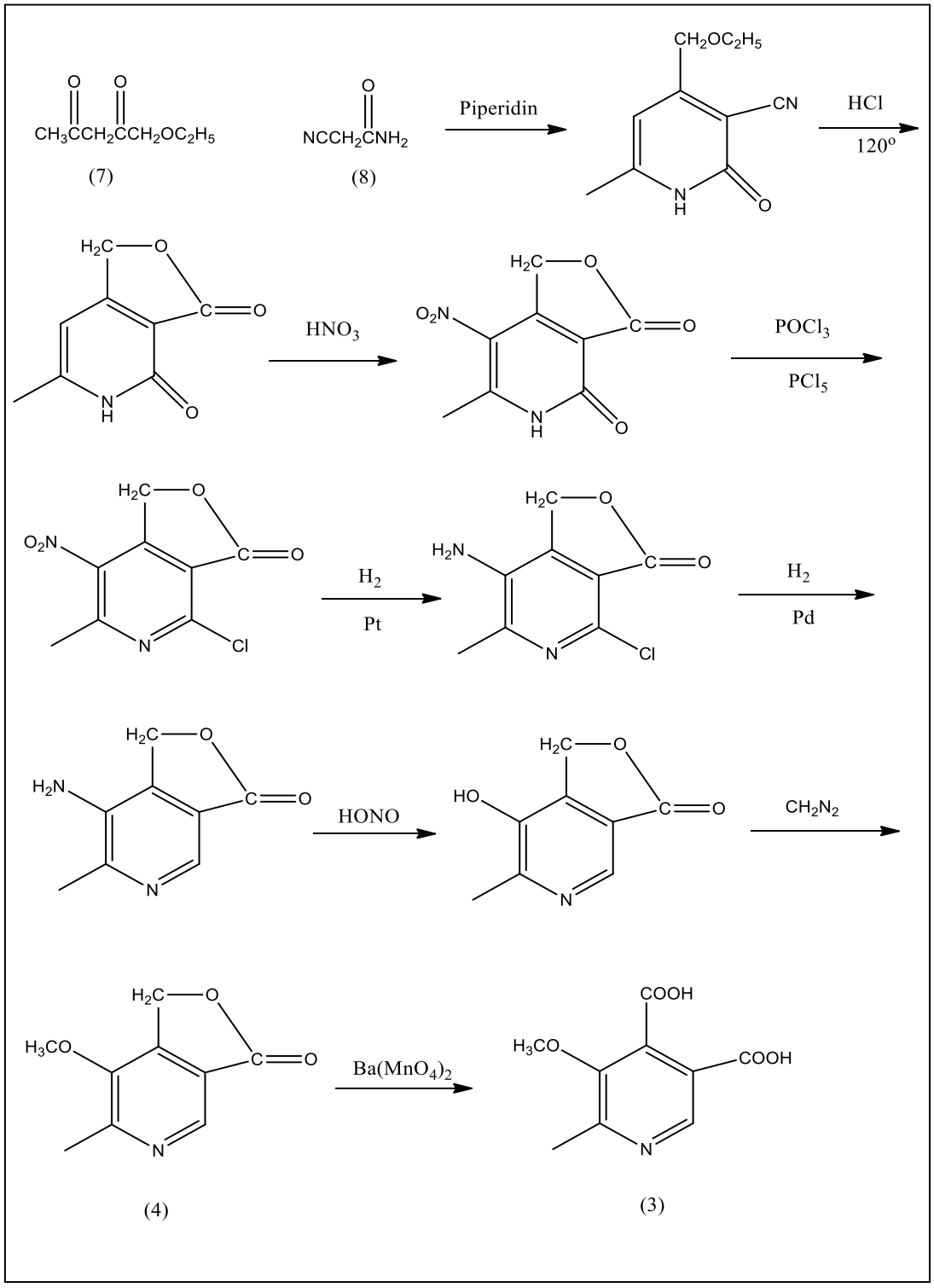
Dokaz da su karboksilne skupine u vicinalnom položaju dobiven je sintezom žutog fluorescentnog ftaleina reakcijom s rezorcinolom. Pretpostavka da se nijedna od karboksilnih skupina ne nalazi u α položaju potvrđena je nemogučnosću dikarboksilne kiseline da daje boju odnosno reagira s željezovim kloridom. Na temelju gore navedenih podataka zaključeno je da se susjedne karboksilne skupine nalaze na 4- i 5- položaju 3-hidroksipiridinske jezgre **[3]**.



Slika 6. *Struktura piridoksina prema Stilleru*

Dikarboksilna kiselina je dobivena iz piridoksina gubitkom četiri atoma vodika i adicijom dva atoma kisika stoga je zaključeno da hidroksimetilne skupine zauzimaju 4- i 5- mjesto piridoksina. Na temelju svih do tada prikupljenih dokaza, struktura vitamina bila je ograničena na dvije mogućnosti, (**1**) i (**6**). Dokaz da je metilna skupinu u položaju dva (**1**) dobiven je formiranjem plave boje reakcijom piridoksina sa 2,6-diklorkinon-klorinid (Gibbsov reagens) u alkalnoj otopini. S obzirom da se plava boja normalno ne dobiva sa *para*-supstituiranm fenolima, moglo se zaključiti da je šesti položaj piridoksina nesupstituiran te su Stiller i njegovi suradnici strukturu (**1**) dodijelili vitaminu **[3].**

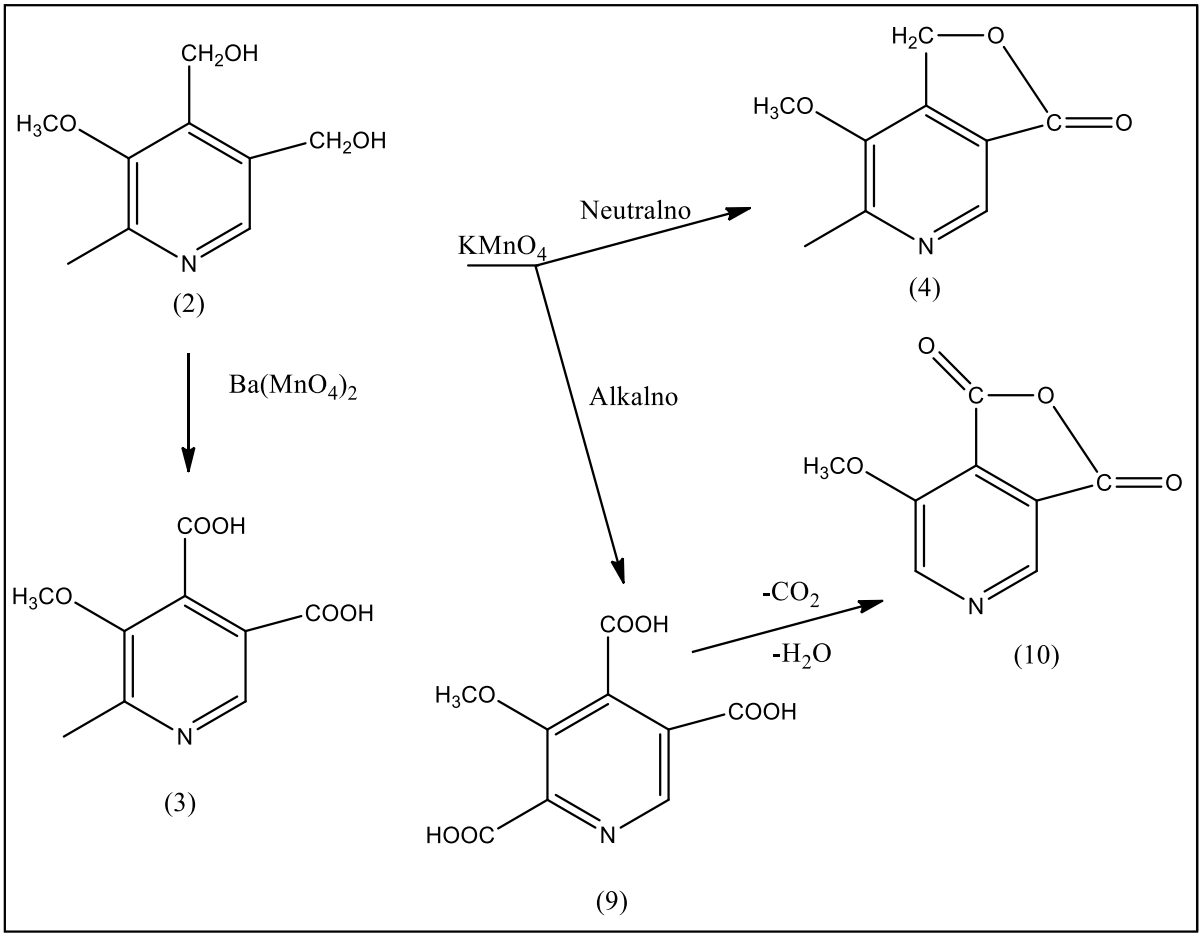
Harris i njegovi suradnici su potvrdili strukturu piridoksina sintezom dikarboksilne kiseline (**3**) i laktona (**4**) iz cijanoacetamida (**8**) i α-acetil-α'-etoksiacetona (**7**), ***Slika 7***.



Slika 7. *Dokaz strukture piridoksina, Harris i suradnici*

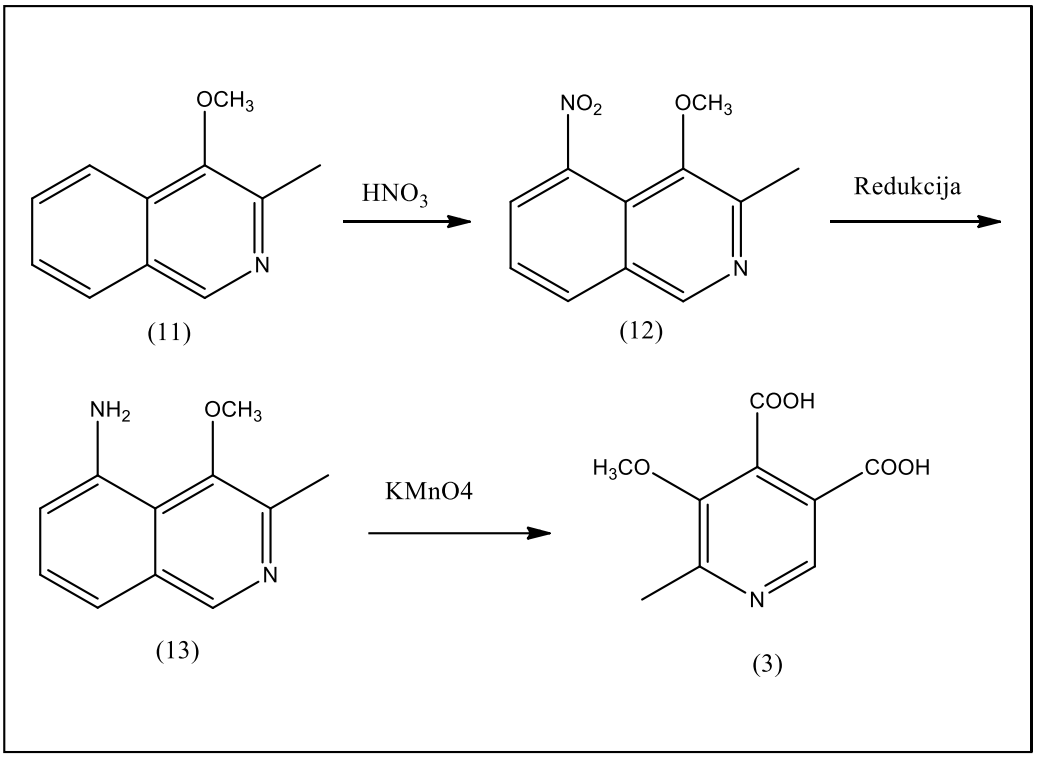
Dokaz za strukturu piridoksina su također, neovisno o ostalima, dali Kuhn i njegovi suradnici (***Slika 8***.). Blagom oksidacijom metil etera (**2**) u neutralnoj sredini dobiven je lakton (**4**). reakcija koja je provedena smatrala se dovoljnim dokazom za vicinalni odnos hidroksimetilnih skupina piridoksina. Oksidacijom u alkalnom mediju s kalijevim permanganatom metil etera (**2**) dobivena je trikarboksilna kiselina (**9**), koja je davala crvenu boju u reakciji s željezovim

sulfatom, potvrda da je C-metilna skupina piridoksina smještena u položaju dva piridinske jezgre. Bilo je jasno da je barem jedna karboksilna skupina u trikarboksilnoj kiselini smještena u na ugljikovom atomu koji je susjedan piridinskom dušiku. Kada je spoj (**9**) monodekarboksiliran i preveden u anhidrid (**10**), produkt nije davao crvenu boju sa željezovim sulfatom. Prema tome zaključeno je da trikarboksilna kiselna ima samo jednu α karboksilnu skupinu u odnosu na piridinski dušikov atom. Zaključeno je da je α karboksilna skupina trikarboksilne kiseline dobivena iz metilne skupine u položaju dva piridinskog prstena **[3]**.



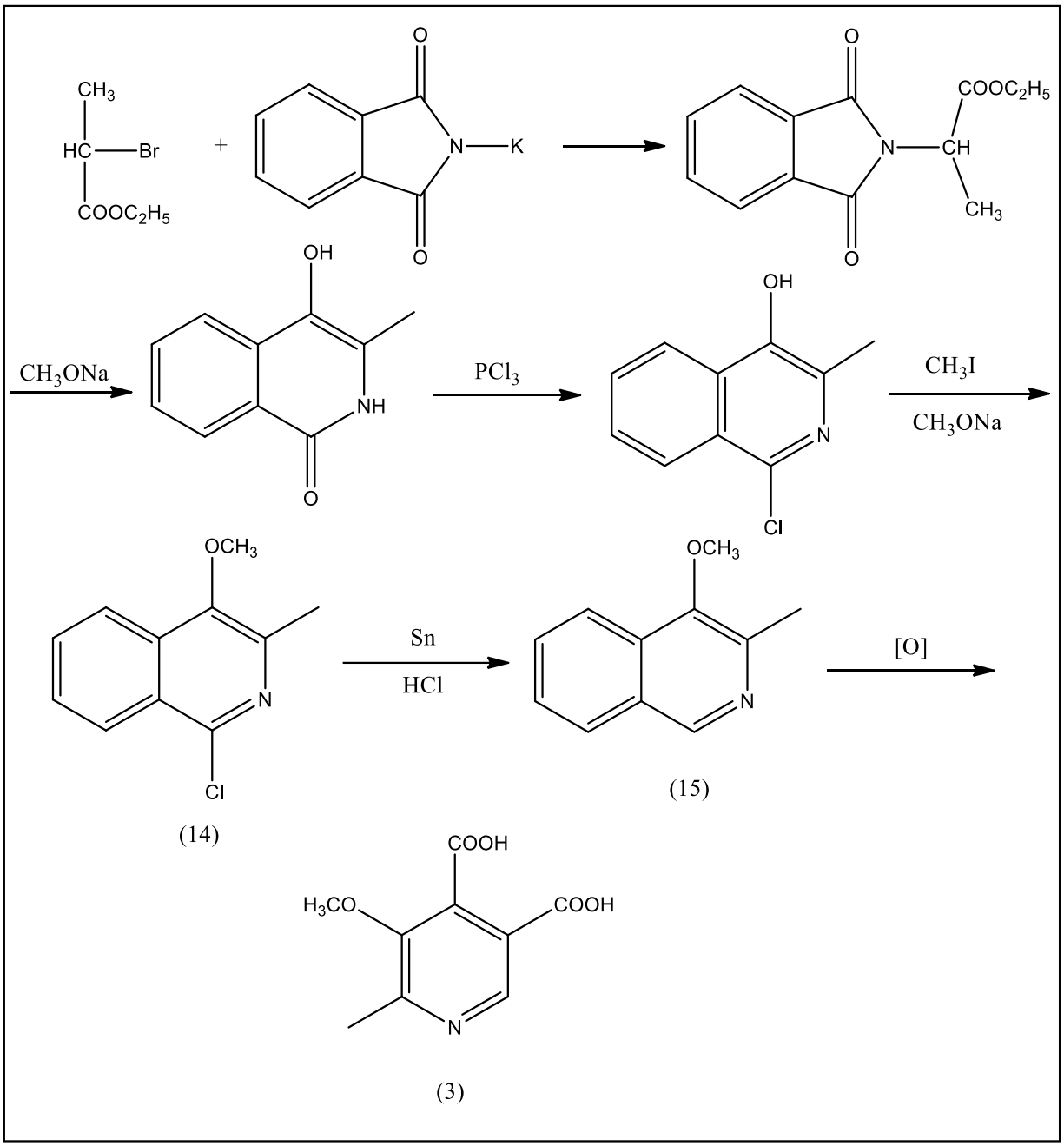
***Slika 8**. Dokaz strukture piridoksina, Kuhn i suradnici*

Kuhn je također potvrdio strukturu piridoksina sintezom dikarboksilne kiseline (**3**), ***Slika 9***. Reakcijom 3-metil-4-metoksiizokinolina (**11**) sa dušičnom kiselom nastaje mono nitro spoj (**12**) koji se potom reducira u odgovarajući amin (**13**). Oksidativnom degradacijom nastalog amina dobivena je dikarbosilna kiselina (**3**) **[3].**



***Slika 9**. Dokaz strukture piridoksina, Kuhn i suradnici*

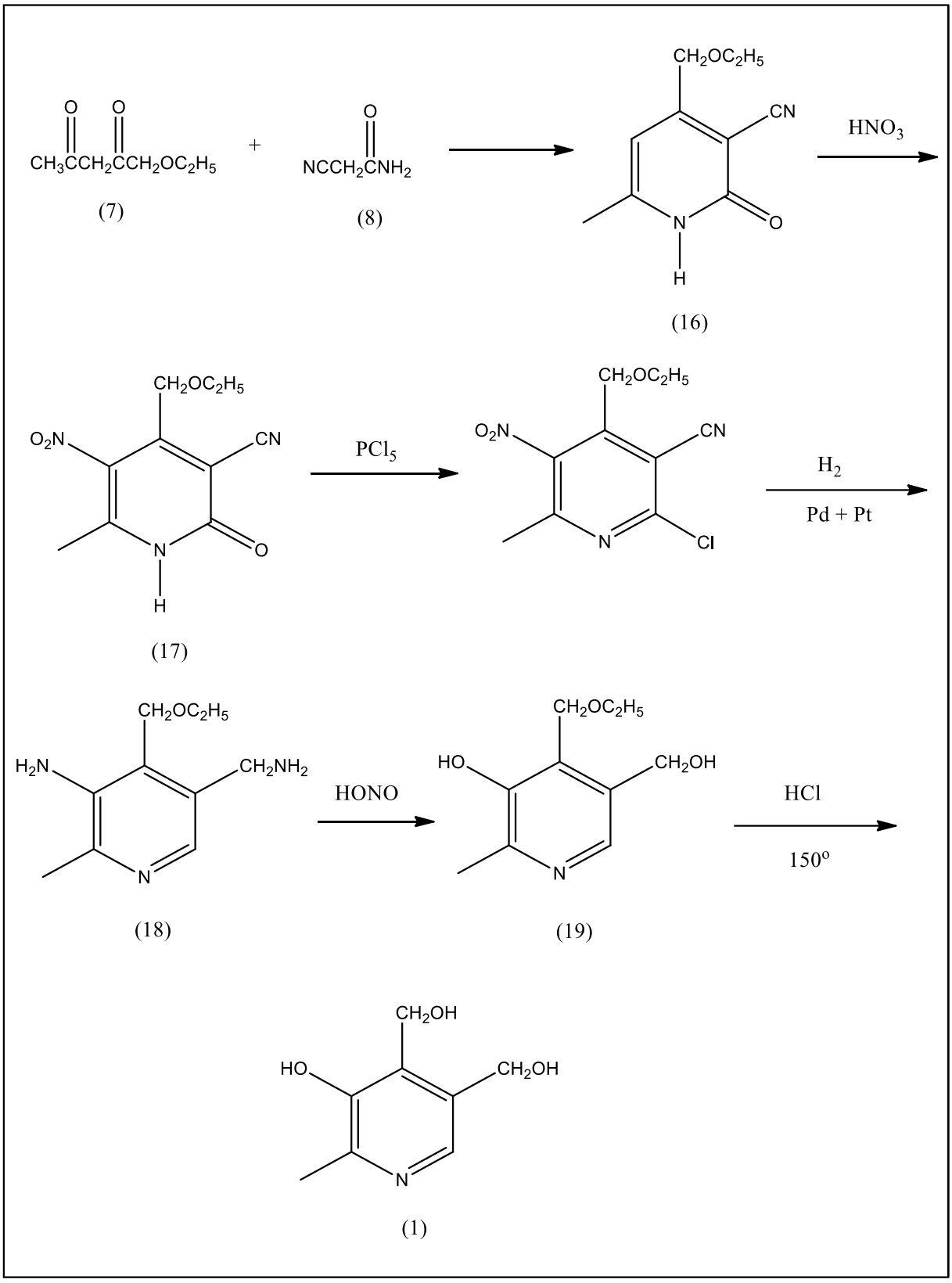
Ichiba i Michi su uspjeli izvršiti sintezu 3-metoksi-2-metilpiridin-4,5-dikarboksilne kiseline (**3**) na drugačiji način. Nakon što su sintetizirali 1-klor-3-metoksi-2-metilizokinolin (**14**), reducirali su ga u 3-metoksi-2-metilizokinolin (**15**), te potom oksidirali do dikarboksilne kiseline (**3**) ***Slika 10***. **[3]**.



***Slika 10**. Sinteza 3-metoksi-2-metilpiridin-4,5-dikarboksilne kiseline, Ichiba i Michi*

Harris i Folkers su sintetizirali piridoksin reakcijom koja započinje kondenzacijom α-acetil-α'-etoksiacetona (**7**) i cijanoacetamida (**8**), ***Slika 11***.

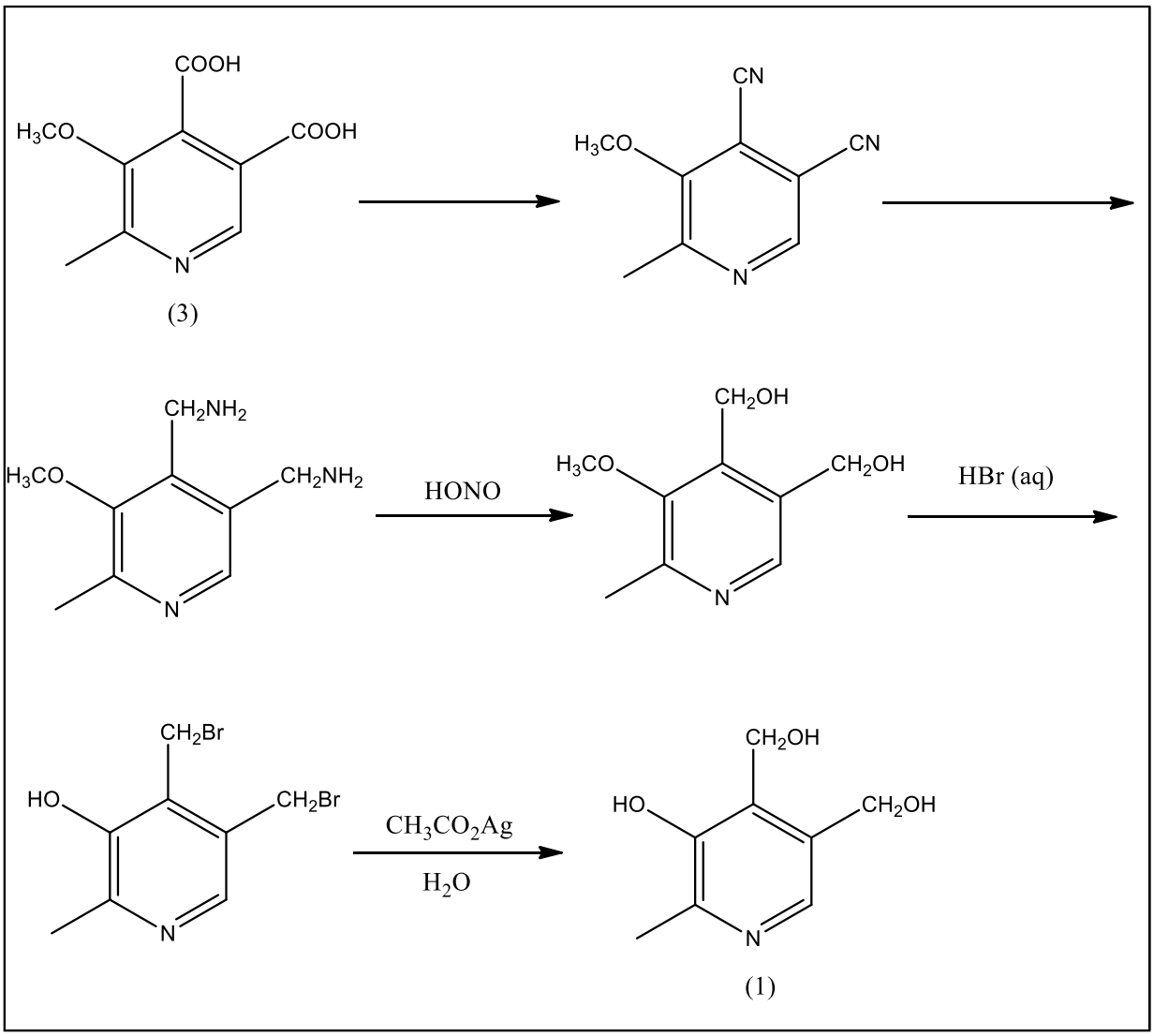
Produkt kondenzacije 3-cijano-4-etoksimetil-6-metil-2-piridon (**16**) sa dušičnom kiselinom daje nitropiridon (**17**), kojim zatim kloriranjem i redukcijom daje 3-amino-5-aminometil-4-etoksimetil-2-metilpiridin (**18**). Reakcijom diamino spoja sa dušikastom kiselinom nastaje 4-etoksimetil-3-hidroksi-5-hidroksimetil-2-metilpiridin (**19**), koji hidrolizom daje piridoksin (**1**) **[3]**.



Slika 11. *Harris i Folker-ova sinteza piridoksina*

Kuhn i suradnici sintetizirali su piridoksin (**1**) iz dikarboksilne kiselinu (**3**) kao polazne sirovine, ***Slika 12***.

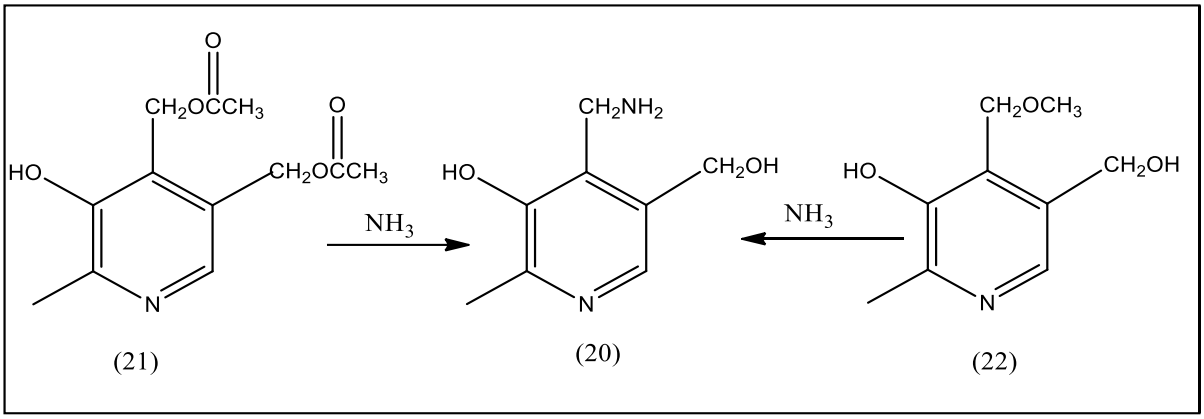
Sinteza je obuhvaćala niz reakcija, najprije prevođenje karboksilnih skupina u nitrilne, zatim redukcija do aminometilne skupine, te konverzija aminometilne skupine u hidroksimetilnu. Zadnji korak sinteze obuhvaćao je kidanje O-metilne skupine sa bromovodičnom kiselinom nakon koje je slijedila hidroliza dibromida u prisutnosti srebrovog acetata **[3]**.



Slika 12. *Sinteza piridoksina iz dikarboksilne kiseline, Kuhn i suradnici*

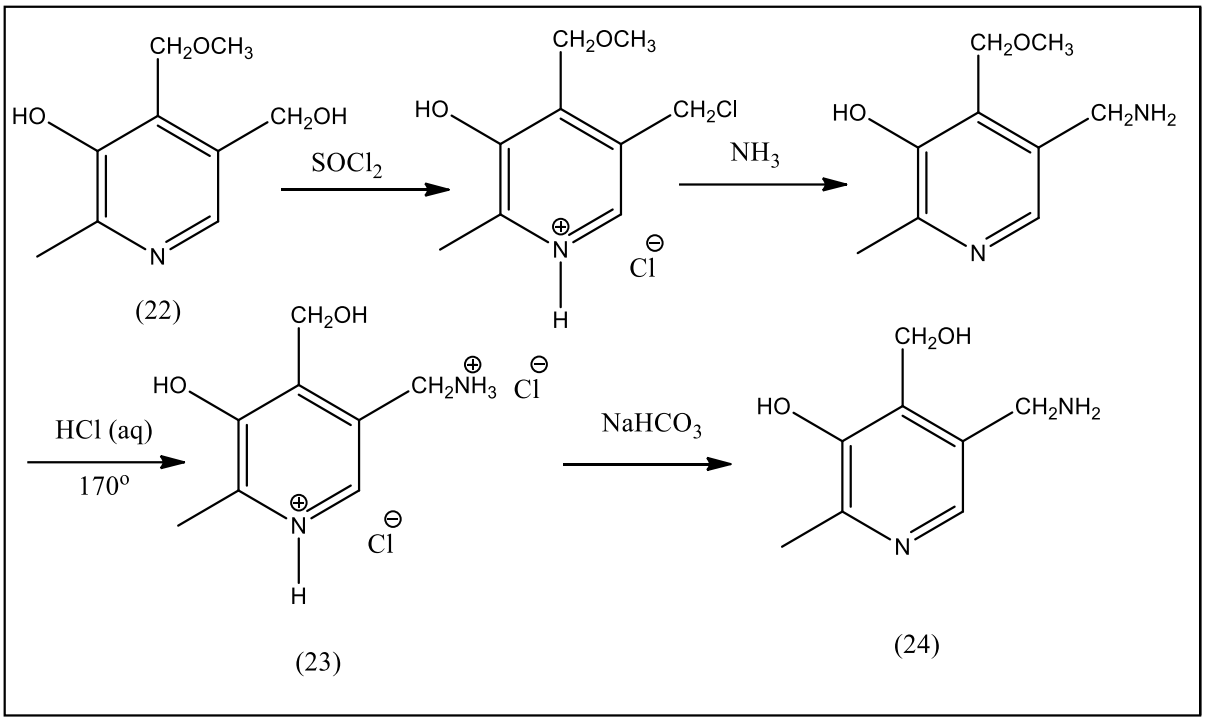
3.2. Sinteza piridoksamina i piridoksala

Sintezu piridoksamina (**20**) prvi su opisali Harris i suradnici, ***Slika 13***. Metoda je uključivala aminaciju ili piridoksin diacetata (**21**) ili 3-hidroksi-5-hidroksimetil-4-metoksimetil-2-metilpiridina (**22**) s amonijakom u metanolu pri 140^{o} C **[3].**



Slika 13. *Sinteza piridoksamina od strane Harrisa i suradnika*

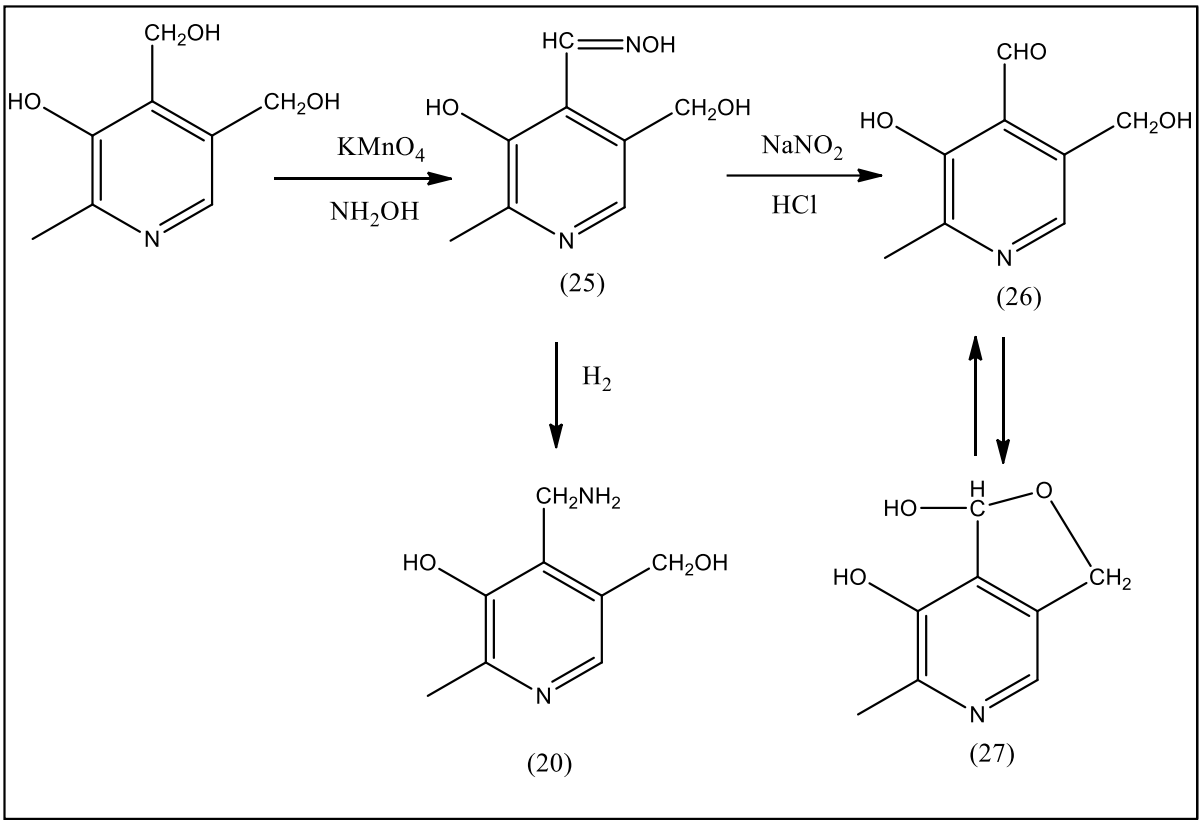
Dodatni dokaz strukture piridoksamina dobiven je sintezom biološki neaktivnog izomera 5-aminometil-3-hidroksi-4-hidroksimetil-2-metilpiridin (izopirisoksamin) (**24**), ***Slika 14***. **[3].**



Slika 14. *Sinteza izopiridoksamina (**24**)*

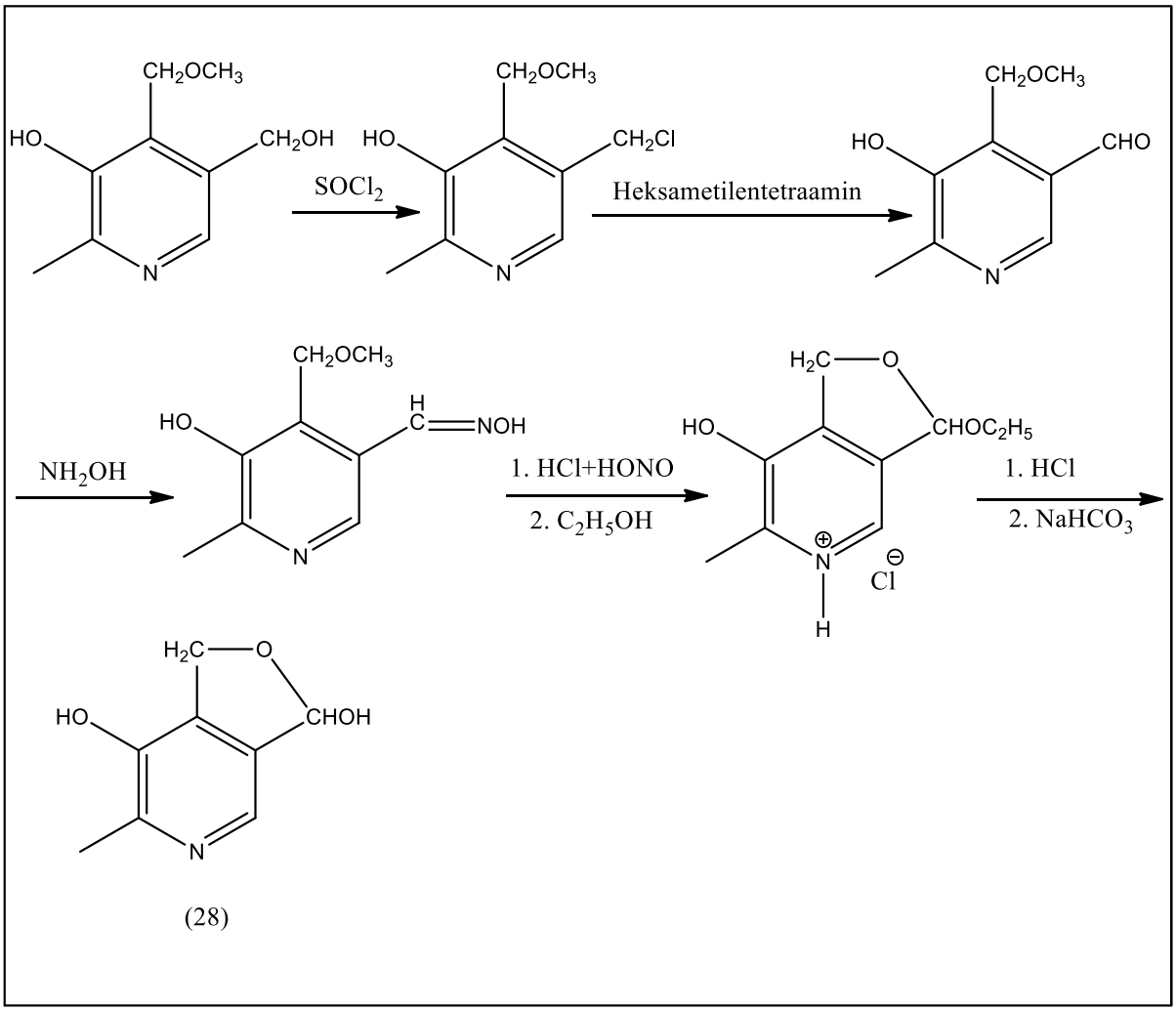
Sinteza spoja (**24**) uključuje reakciju 3-hidroksi-5-hidroksimetil-4-metoksimetil-2-metilpiridina (**22**) s $SOCl_2$, zatim slijedi aminacija te naknadno uklanjanje metoksilne skupine na četvrtom supstituentu pri čemu se dobije dihihroklorid (**23**). Neutralizacijom sa natrijevim bikarbonatom nastaje spoj (**24**) **[3].**

Znanstvenici su uspjeli sintetizirati piridoksal uz pažljivu oksidaciju piridoksina kalijevim permanganatom i izolirati ga kao oksim (**25**), ***Slika 15***. Djelovajem natrijevog nitrita i klorovodične kiseline na oksim dobije se piridoksal, koji može postojati kao aldehid (**26**) ili kao ciklički acetal (**27**). Katalitičkom hidrogenacijom piridoksal oksima (**25**) nastaje piridoksamin (**20**), uz cink i octenu kiselinu kao reagense **[3].**



Slika 15. *Sinteza piridoksala*

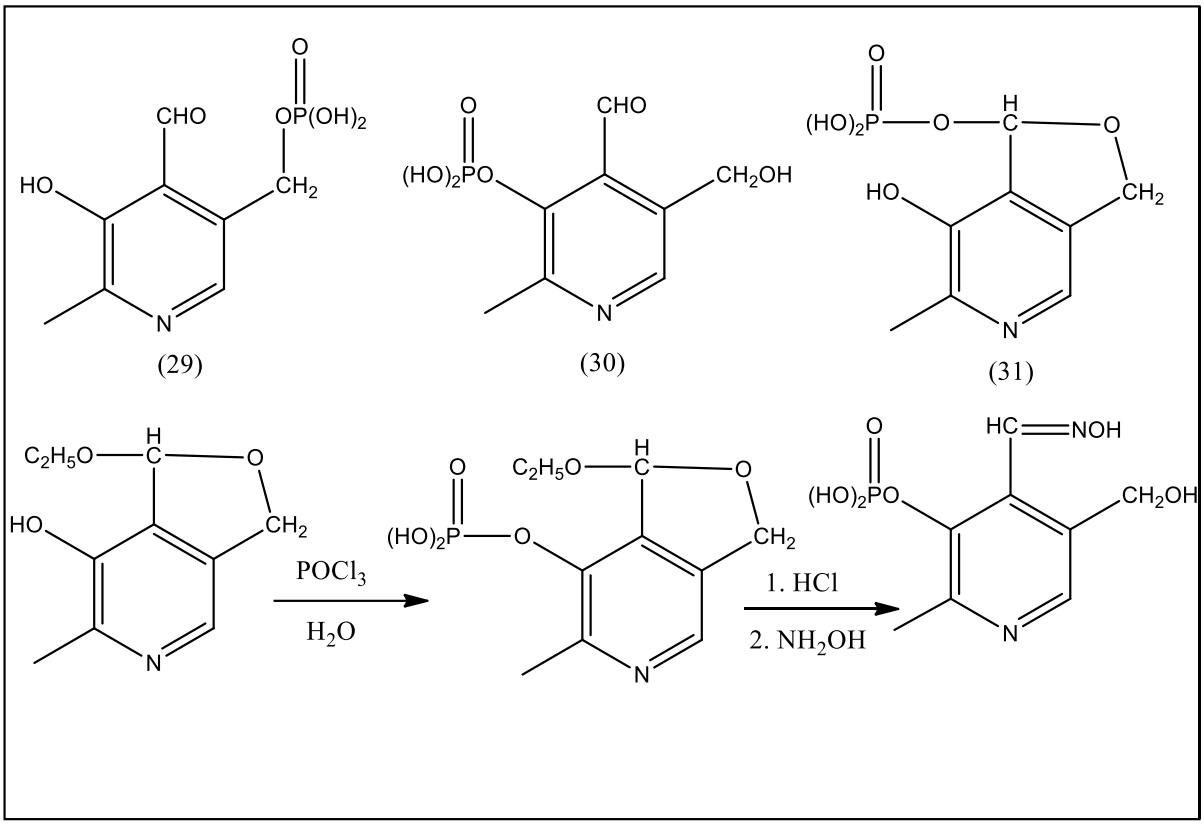
Dokaz strukture piridoksala dobiven je i sintezom izopiridoksala (**28**), ***Slika 16*****. [3]**.



Slika 16. *Sinteza izopiridoksala*

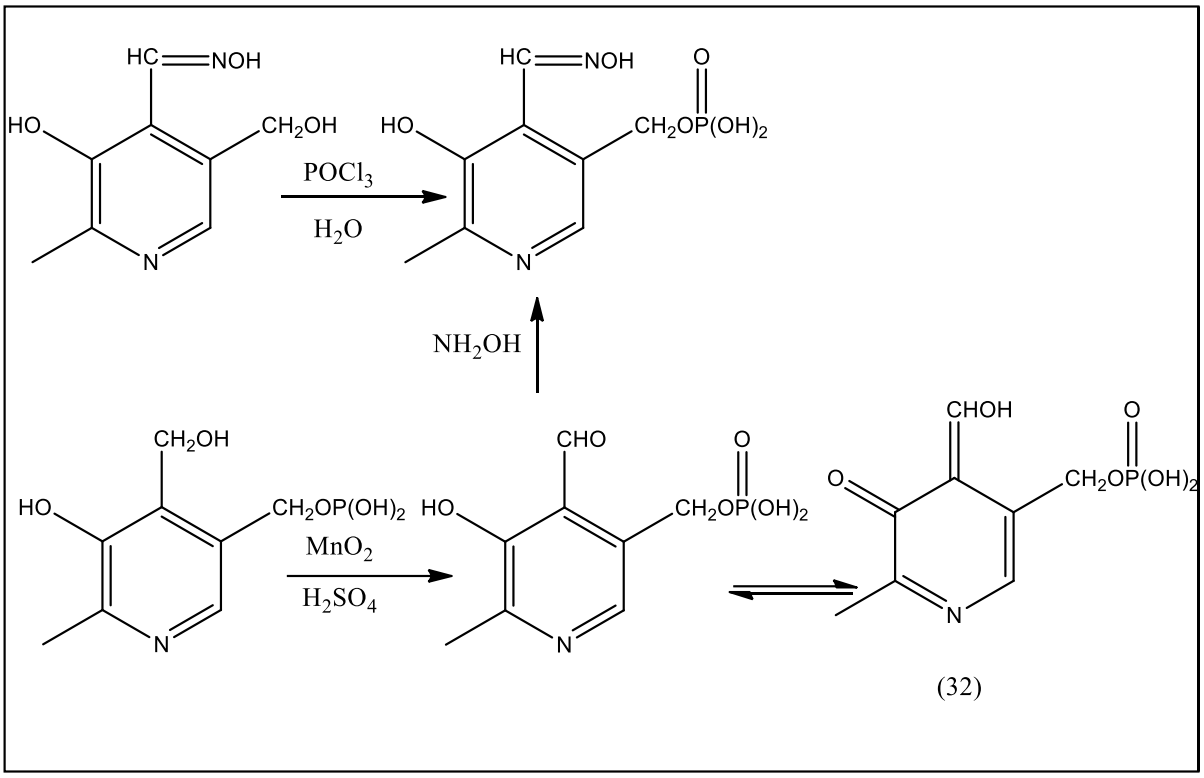
3.3. Piridoksal fosfat i piridoksamin fosfat

Piridoksal fosfat se u početku sintetizirao uz malo iskorištenje reakcijom fosforova oksiklorida i piridoksala u prisutnosti vode. Izolaciju piridoksal fosfata iz takve reakcijske smjese kao kalcijeve soli, te potvrdu strukture kao 4-formil-3-hidroksi-2-metil-5-piridilmetilfosforna kiselina (**29**), objavili su Heyl i suradnici **[3]**.



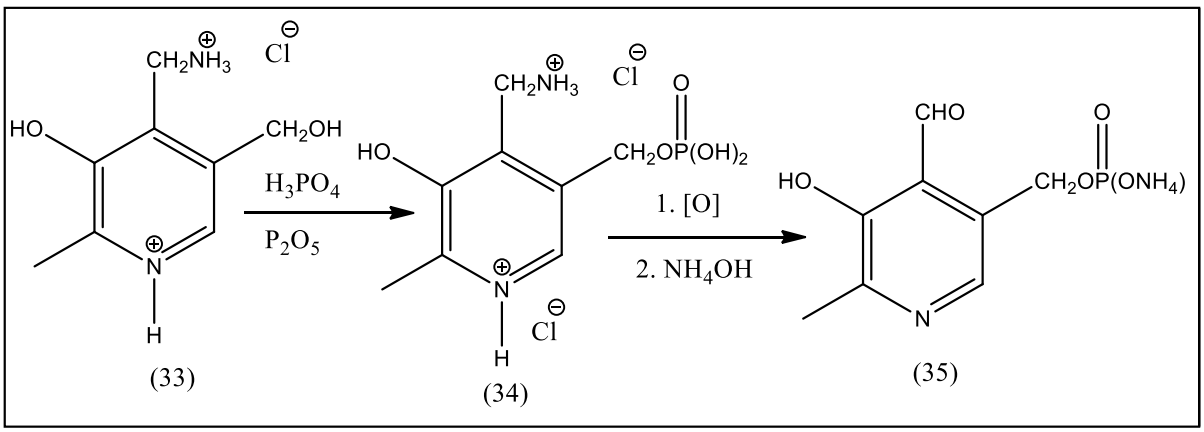
***Slika 17**. Dokaz strukture piridoksal fosfata, Heyl i suradnici*

Na temelju analitičkih podataka koji su ranije bili poznati pretpostavilo se da bi piridoksal fosfat mogao imati tri strukture (**29**), (**30**) i (**31**), ***Slika 17.*** Struktura sa fosforiliranom fenolnom skupinom (**30**) je bila eliminirana kao rezultat negativnog testa sa željezovim kloridom za slobodnu fenolnu skupinu. Struktura (**31**) sa fosforiliranim C-4 hemiacetalnim ugljikovim atomom je također bila isključena zato što je isti oksim piridoksal fosfata dobiven ili fosforilacijom piridoksal oksima ili oksidacijom piridoksin fosfata nakon koje je slijedila konverzija u oksim (***Slika 18***.). Piridoksal fosfat (**29**) je bio negativan na Gibbsov fenolni test, što je značilo da je fenolna skupina piridoksal fostat i da nije slobodna. Pomak u maksimumu ultraljubičastog absorpcijskog spektra piridoksal fosfata u alkalnoj otopini prema većim valnim duljinama, nego što je kod piridoksala objašnjeno je postojanjem keto oblika (**32**) pri određenom pH **[3]**.



***Slika 18**. Dokaz za strukturu piridoksal fosfata*

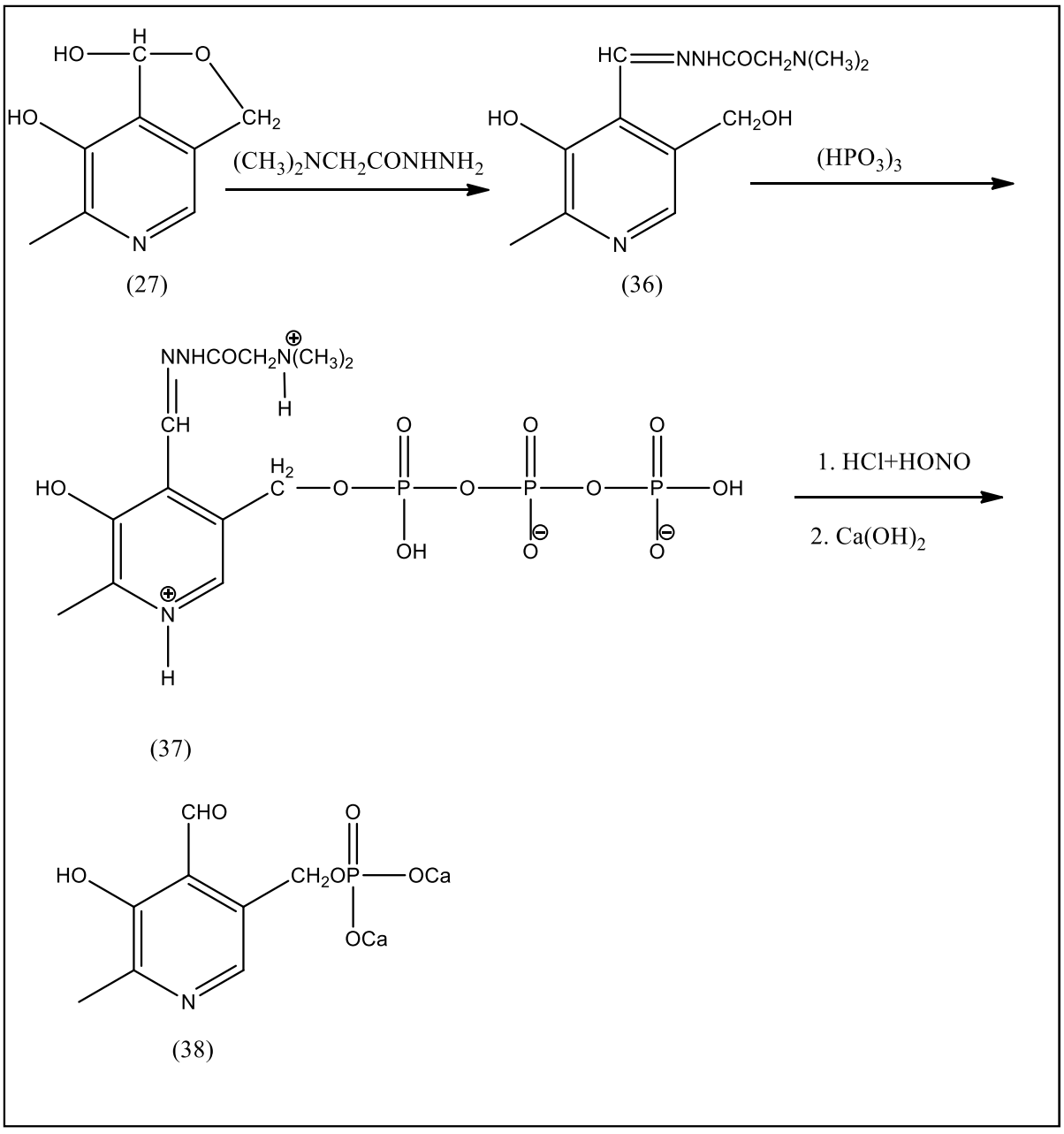
Sinteza piridoksal fosfata od strane Wilsona i Harrisa (***Slika 19***.) izvršena je fosforilacijom piridoksamin dihidroklorida (**33**) sa anhidridom fosforne kiseline, a potom oksidacijom amino skupine u formilnu. Produkt (**34**) je bio adsorbiran na stupcu aktivnog ugljena, kisik koji je također bio adsorbiran na aktivnom ugljenu, pretvorio je amino skupinu u formilnu, eluiranjem sa amonijevim hidroksidom dobivena je amonijeva sol piridoksal fosfata (**35**) **[3]**.



***Slika 19**. Sinteza amonijeve soli piridoksal fosfata*

Sinteza piridoksal fosfata od strane Viscontinija i suradnika uključivala je prvo konverziju piridoksala (**27**) u *N*,*N*-dimetilglicilhidrazon (**36**), koji je potom fosforiliran s metafosfornom

kiselinom, ***Slika 20***. Dobiveni ester 5-trifosforne kiseline (**37**) je hidroliziran s klorovodičnom kiselinom u prisutnosti dušikaste kiseline pri čemu je dobiven piridoksal fosfat koji je izoliran kao kalcijeva sol (**38**) **[3]**.



Slika 20. *Sinteza kalcijeve soli piridoksal fosfata*

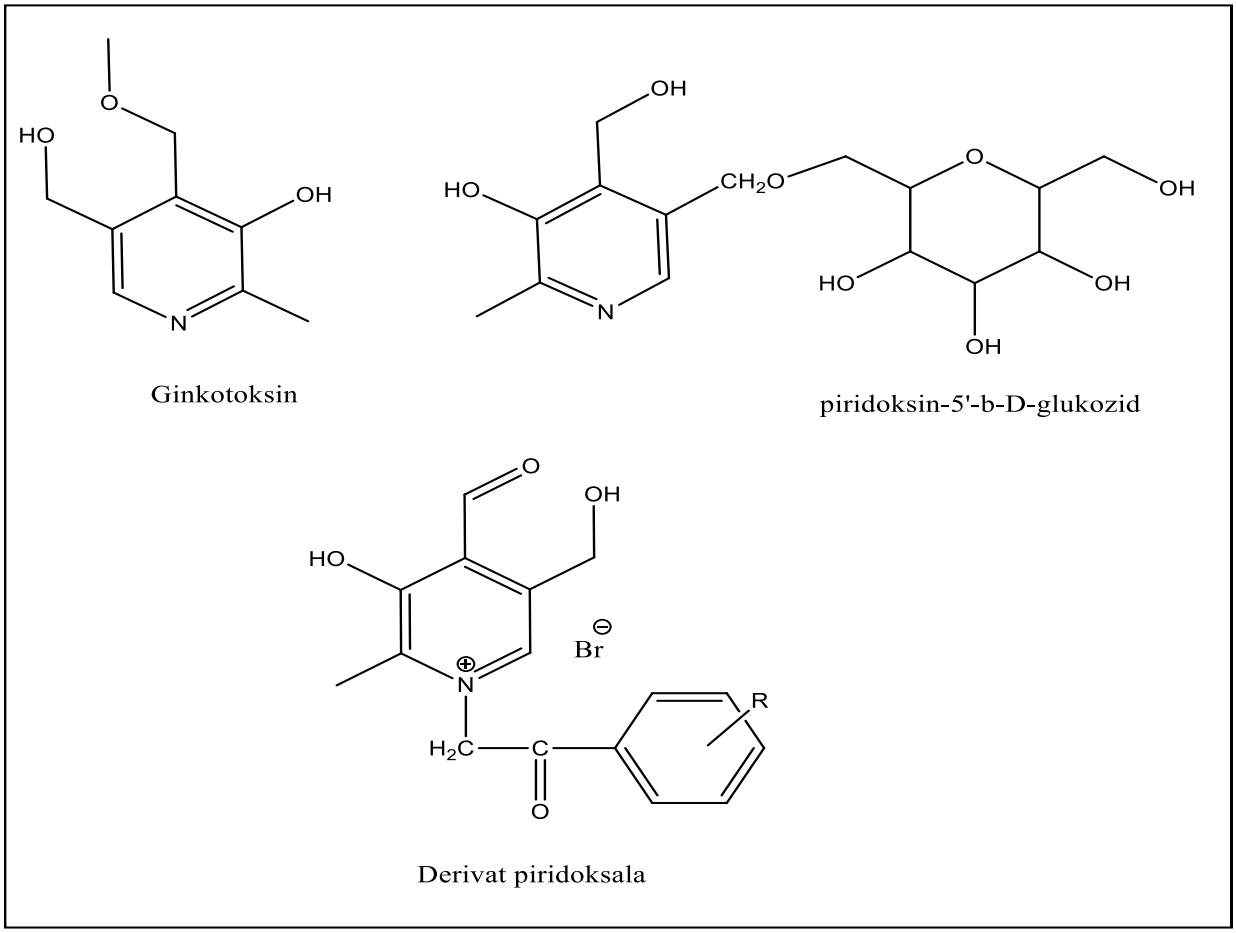
Heyl i njegovi suradnici su sintetizirali piridoksamin fosfat direktnom fosforilacijom piridoksamina u vodenoj otopini sa fosforovim oksikloridom. Produkt je izoliran i karakteriziran kao kristalni di-*p*-toluensulfonil derivat.

4. RAZNOLIKOST DERIVATA VITAMINA B_6

Za mnoge od derivata vitamina B_6 još uvijek nije određena točna funkcija ali se pretpostavlja da bi mogli imati ključnu ulogu u razumijevanju bioloških značajki vitamina B_6.

Ginkotoksin (4'- metilpiridoksin) iz stabla *Ginko biloba* i afričkog stabla *Albizia julibrisson* je jedan od derivata vitamina B_6. *Albizia julibrisson* također sintetizira druge kompleksnije derivate ali biološki mehanizam sinteze nije potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da ginkotoksin služe kao zaštitni spojevi od patogena zbog svoje toksičnosti. Ginkotoksin je pronađen u različitim tkivima stabla, a najviša koncentracija je u sjemenkama. **[9]**.

Nekoliko derivata vitamina B_6 osobito derivata piridoksina postoje u biljkama kao β-D-glukozidi. Glavni oblik glukoziliranog vitamina B_6 je piridoksin-5'-β-D-glukozid, koji zauzima od 5 do 80% ukupne količine vitamina B_6 u biljkama. Glikozilirani oblici su obilni i nalazimo ih u soji, riži i stablu *Ginka bilobe*. Ne postoji objašnjenje za ovu veliku količinu glikozilirinog vitamina B_6, ali moguće objašnjenje bi bilo da oni zapravo mogu služiti kao spojevi koji će pohraniti vitamine ili čak i ugljikohidrate. Primjeri nekih derivata vitamina B_6 prikazani su na ***Slici 21***. **[9]**.



Slika 21. *Neki derivati vitamina B6*

Znanstvenici su otkrili da se određeni fiziološki aktivni kemijski spojevi mogu dobiti ukoliko se tvari tretiraju s vitaminom B_6 i nekim od vitamina topljivih u masti, kao npr. A ili D u istom otapalu. Ove tvari koje su potrebne u pripremi derivata vitamina B_6 su se dobivala ekstrakcijom rižinih mekinja uz zakiseljavanje vode. Zatim je uslijedila adsopcija aktivne tvari, te obrada eluata i tretiranje eluata sa agensom za aciliranje. Naravno moguće su i druge metode priprave prigodnog vitamina B_6 ili se sam sintetički vitamin B_6 može koristiti. **[6]**

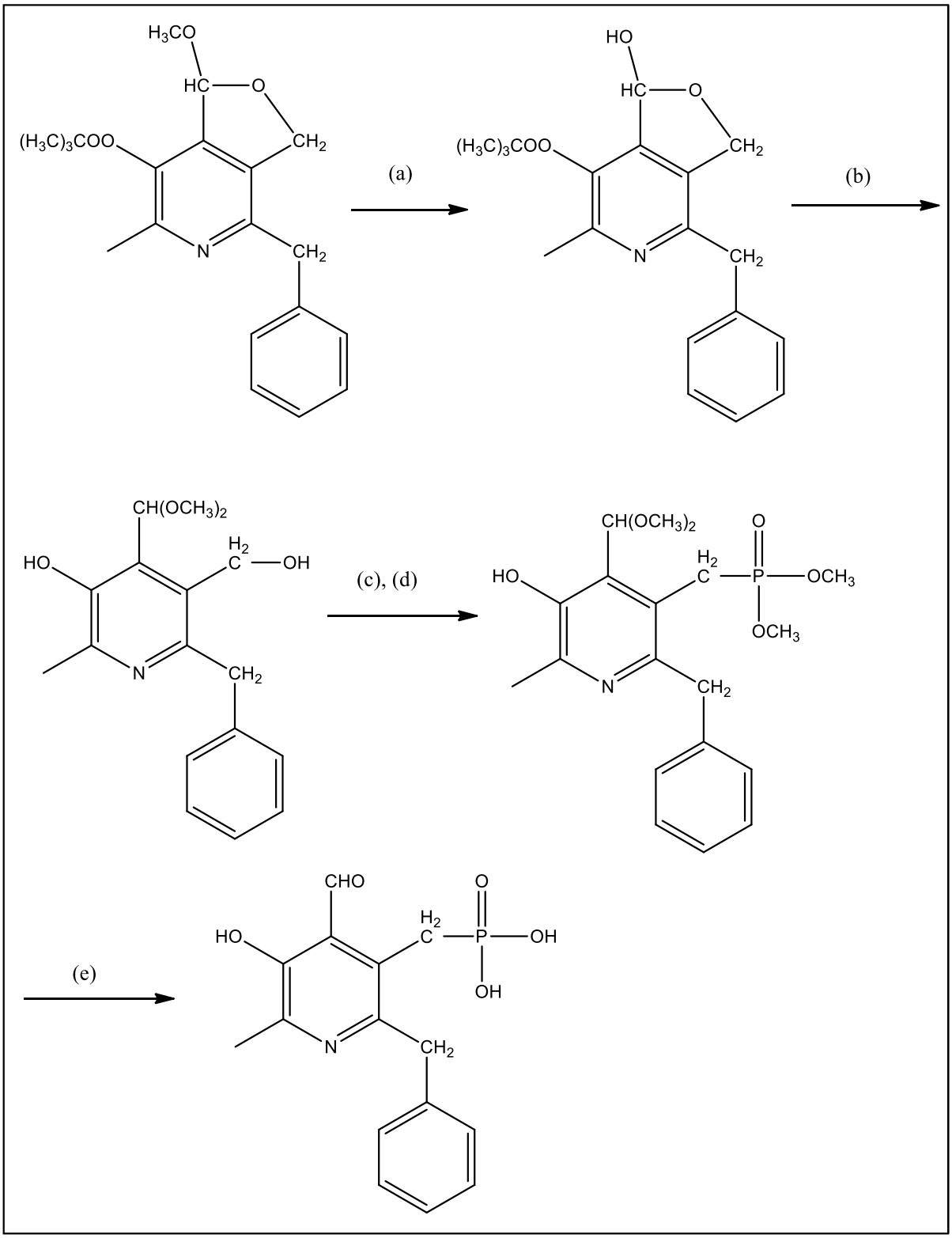
U pripremi ovih novih tvari, u prvom koraku se tretira odgovarajući koncentrat, s kiselinom i lužinom, koji uzrokuje uklanjanje i kemijsku modifikaciju nekih inaktivnih prisutnih tvari. Pod pojmom inaktivne tvari se ovdje misli na tvari koje posjeduju različitu fiziološku aktivnost od vitamina B_6, kao što su vitamin B_1, nikotinska kiselina, laktoflavin i drugi. **[6]**

Modificirani postupak može uključivati uklanjanje neaktivne i/ili kemijski izmijenjenog materijala ekstrakcijom s odgovarajućim otapalom i naknadnim razvajanjem ovih fiziološki aktivnih tvari iz drugih neaktivnih materijala. **[6]**

Završni korak se sastoji od aciliranja tvari koje sadrže vitamin i daljnjim razdvajanjem željenog aciliranog vitamina ekstrakcijom s kloroformom. **[6]**

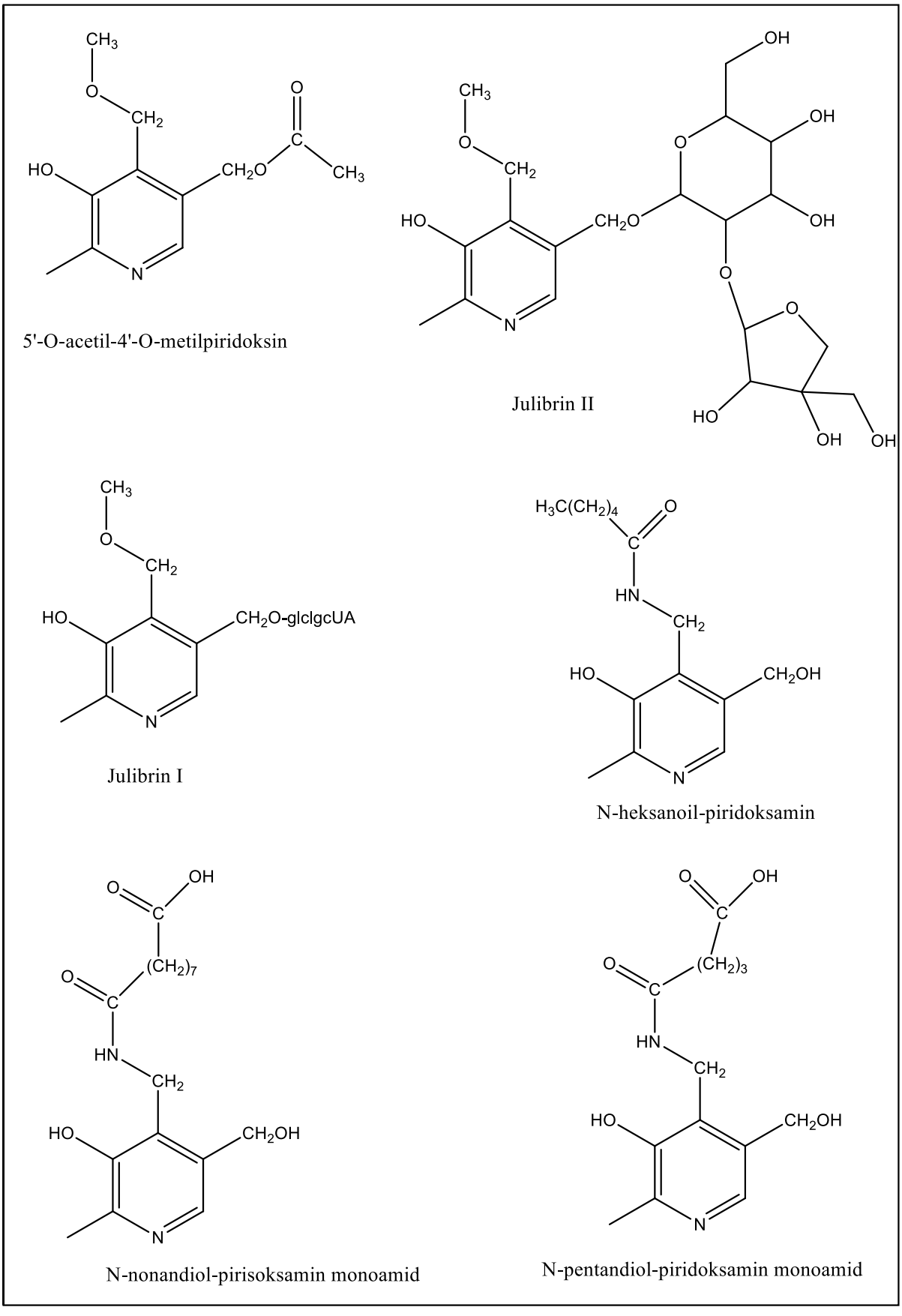
Ukoliko se aktivne tvari izoliranju iz drugih spojeva, različitih od rižinih mekinja, postupak se prilagođava ili se dopunjava s npr. taloženjem s etil nitritom, ili drugim postupcima koji uključuju blago oksidacijske agense kao 10% dušična kiselina.**[6]**

Slika 22. prikazuje primjer sinteze derivata piridoksala, odnosno 6-benzilnog analoga piridoksal-5'-fosfat-6-azo-fenil-2,4-disulfonata. Potrebni reagensi: (a) sumporna kiselina u acetonu, (b) kalijev hidroksid u metanolu, (c) sulfilni klorid u benzenu (d) trimetilfosfit, 70^0, 4 dana, (e) trimetilsilil bromid u metilen kloridu, preko noći. **[7]**



Slika 22. *Sinteza 6-benzilnog analoga*

U derivate vitamina B_6 spadaju i 5'-acetil-4'-O-metilpiridoksin, Julibrin I, Julibrin II, N-heksanoil-piridoksamin, N-nonandiol-pirisoksamin monoamid, N-pentandiol-piridoksamin monoamid, 5'-deoksipiridoksal, 4'-deoksipiridoksin-5'-fosfat i mnogi drugi. Strukture nekih od ovih spojeva su prikazani na ***Slici 23.*** **[8]**



Slika 23. *Derivati vitamina B6*

5. ZAKLJUČAK

Vitamini i minerali su tvari koje su nam potrebne u manjim količinama za normalno funkcioniranje organizma. Kao rezultat njihovog nedostatka može doći do određenih poremećaja u organizmu i bolesti. Vitamini mogu biti topljivi u masti (D, E, K, A) ili u vodi (B, C). Vitamini B uključuju biotin, folat, niacin, pantotenu kiselinu, riboflavin, tiamin, vitamin B_6 i B_{12}. Vitamin B_6 obuhvaća šest spojeva: piridoksin- alkohol, piridoksal- aldehid i piridoksamin – primarni amin te njihove fosforilirane derivate.

Godine 1934., Paul György je otkrio spoj koji je mogao izliječiti bolest kože kod štakora i nazvao ga vitamin B_6. Godine 1939. Harris i Folkers su izvršili prvu sintezu piridoksina, a 1945. godine Snell je otkrio dvije nove strukture, piridoksal i piridoksamin. Nadalje mnogi su znanstvenici uspjeli izolirati i sintetizirati ove spojeva na različite načine. U novije vrijeme brojna su istraživanja derivata i novih analoga vitamina B_6 koji mogu imati potencijalno biološko djelovanje.

6. POPIS LITERATURE

[1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[2] P. Bilski, M. Y. Li, M. Ehrenshaft, M. E. Daub, C. F. Chignell, Vit*amin B_6 (Pyridoxine) and Its Derivatives Are Efficient Singlet Oxygen Quenchers and Potential Fungal Antioxidants*, Photochemistry and Photobiology, 71(2), 2000., 129–134

[3] H. G. Brooks, Jr. , *Vitamin B_6 derivatives and related compounds*, Iowa State University Of Science and Technology Ames, Iowa, 1961.

[4] J. S. Casasa, D. Couceb, J. Sordoa, *Coordination chemistry of vitamin B_6 and derivatives: A structural overview,* Volumen 256, 2012., 23–24, 3036–3062

[5] L. J. Dunne, *Nutrition almanac/ Nutrition Search, Inc*., John D. Kirschmann, 3rd. edition, McGraw Hill, 1990.

[6] J. C. Keresztesy, Westfield, J. R. Stevens, Rahway, *Acyl derivatives of vitamin B_6,* Inc., Rahway, N. J., 11, 1942., 468-688

[7] Y.-C. Kim, J.-S. Lee, K. Sak, F. Marteau , L. Mamedova , J.-M. Boeynaems, K. A. Jacobson, *Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor*, Biochemical Pharmacology, 70, 2005., 266–274

[8] S. Mooney, J.-E. Leuendorf, C. Hendrickson, H. Hellmann, *Vitamin B_6: A Long Known Compound of Surprising Complexity*, Molecules, 14, 2009., 329-351

[9] V. R. Preedy, *B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, 2013.

[10] M. A. Vazquez, F. Munoz, J. Donoso, F. Garcia Blanco, *Schiff bases of alfa – amino acids and vitamin B_6 derivatives in surfactant media. A model for the coenzyme behaviour in PLP-dependent enzymes*, Biochem. (Life Sci. Adv.), 1992., 241-254.

Web izvori :

[11] http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-B6 (4.4.2016.)

[12] http://www.studyandexam.com/vitamin-b6.html (4.4.2016.)